

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva de oxibutinina e *N*-desetiloxibutinina:
aplicação em estudo de biotransformação *in vitro*.**

Patrícia da Fonseca

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva de oxibutinina e *N*-desetiloxibutinina:
aplicação em estudo de biotransformação *in vitro*.**

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de Pós-graduação em
Toxicologia para a obtenção do Título de
Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Patrícia da Fonseca

Orientadora: Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

da-Fonseca, Patrícia

Análise enantiosseletiva de oxibutinina e *N*-desetiloibutinina: aplicação em estudo de biotransformação *in vitro*, Ribeirão Preto, 2008.

79 p. : il.; 30cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli

1. Oxibutinina. 2. Análise enantiosseletiva. 3. Biotransformação *in vitro*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia da Fonseca

Análise enantiosseletiva de oxibutinina e *N*-desetiloxibutinina: aplicação em estudo de biotransformação *in vitro*.

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A todos que torceram e acreditaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar com tantas oportunidades;

À minha família, particularmente meus queridos pais, José e Leonor, pelo amor, incentivo e ensinamentos;

Ao Renato, amado e amigo. Pela motivação e companheirismo;

À orientadora e amiga Dra. Pierina, por ter me recebido no CROEC e pelo enriquecimento científico, profissional e pessoal proporcionado neste período;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao departamento de Física e Química pela possibilidade de realização deste trabalho;

Aos amigos do grupo de pesquisa CROEC: Anderson, Igor, Fernando, Keyller, Naíssa, Thiago e Martin, por todos os momentos;

Aos funcionários do departamento de Física e Química: Valquíria, Perpétua, Solange, Roberto e Rosana pelo auxílio técnico;

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação da FCFRP (Ana, Rosana e Eleni) pela colaboração;

Aos professores Luis Alexandre Pedro de Freitas, Luis Felipe Ribeiro Pinto, Carlos Curti e Laura Tiemi Okano pelo auxílio técnico e disponibilidade em ajudar;

À Márcia e Lídio pelo incentivo e auxílio na finalização da dissertação;

Ao amigo Cezar por ceder seu tempo e compartilhar sua experiência;

À Ana, Gisele e Márcia, amigas em todos os momentos;

À FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsa de estudo.

RESUMO

da-Fonseca, P. **Análise enantiosseletiva de oxibutinina e *N*-desetiloxibutinina: aplicação em estudo de biotransformação *in vitro***. 2008. 79f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A oxibutinina é um fármaco quiral empregado na forma de racemato que, após administração por via oral, sofre biotransformação hepática pronunciada levando à formação de *N*-desetiloxibutinina. Este metabólito apresenta atividade anticolinérgica semelhante a da oxibutinina, contribuindo com o efeito farmacológico e, também, com os efeitos adversos. Em relação às propriedades farmacocinéticas, alguns estudos prévios indicam que a biotransformação é estereosseletiva. Assim, propôs-se o desenvolvimento e validação de um método para análise dos enantiômeros do fármaco e seu metabólito em fração microssomal de fígado de ratos. O método foi desenvolvido empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção em 262 nm; a separação dos enantiômeros do fármaco e metabólito foi efetuada em uma coluna Chiralpak AD, empregando hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) com 0,3% de dietilamina como fase móvel, na vazão de 0,9 mL min⁻¹. A microextração em fase líquida (LPME) foi empregada como técnica de preparação das amostras e o método foi otimizado empregando planejamento fatorial. A seguinte condição final de extração foi selecionada: tempo de extração de 45 min, nenhuma adição de metanol ou NaCl, agitação da amostra a 4500 rpm, membrana de 6 cm de comprimento, fase doadora em pH 8,0 e ácido trifluoroacético 0,1 mol L⁻¹ como fase aceptora. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 312 – 5000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da oxibutinina e 250 – 5000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros do metabólito. As recuperações foram de 61 e 55% para a (*R*)-oxibutinina e (*S*)-oxibutinina, respectivamente e de 70 e 72% para a (*R*)-*N*-desetiloxibutinina e (*S*)-*N*-desetiloxibutinina, respectivamente. Obteve-se precisão com coeficientes de variação inferiores a 15% e exatidão com erros relativos menores que 15%. O método foi aplicado em um estudo de biotransformação *in vitro* empregando a fração microssomal de fígado de ratos. As constantes cinéticas foram determinadas e verificou-se uma pequena diferença de afinidade da enzima pelos enantiômeros da oxibutinina ($K_m = 9,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $7,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para a (*R*)-oxibutinina e a (*S*)-oxibutinina, respectivamente), com maior afinidade à (*S*)-oxibutinina em função do menor valor de K_m .

Palavras-chave: oxibutinina, *N*-desetiloxibutinina, análise enantiosseletiva, biotransformação.

ABSTRACT

da-Fonseca, P. **Enantioselective analysis of oxybutynin and *N*-desethyloxybutynin: application to an *in vitro* biotransformation study.** 2008. 79f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Oxybutynin is a chiral drug used as a racemate which, after oral administration, suffers pronounced liver biotransformation leading to the formation of *N*-desethyloxybutynin. This metabolite shows anticholinergic activity similar to the oxybutynin, contributing to the pharmacological effect and also with the adverse effects. Regarding the pharmacokinetic properties, some studies indicate the stereoselective biotransformation. Thus, it was proposed the development and validation of an enantioselective method for analysis of oxybutynin and its metabolite in rat liver microsomal fraction. The method was developed using high-performance liquid chromatography with detection at 262 nm; the separation of drug and metabolite enantiomers was performed on a Chiralpak AD column employing hexane: isopropanol: ethanol (95:4:1, v/v/v) plus 0.3 % diethylamine as the mobile phase, at a flow rate 0.9 mL min⁻¹. Liquid phase microextraction was used for preparation of the samples and the method was optimized using factorial design; the following condition was established: extraction time of 45 min, no methanol and NaCl in donor phase, agitation of the sample at 4500 rpm, membrane of 6 cm in length, donor phase pH 8.0 and trifluoroacetic acid 0.1 mol L⁻¹ as acceptor phase. The method was linear over the range of 312 – 5000 ng mL⁻¹ for oxybutynin enantiomers and over the range of 250 – 5000 ng mL⁻¹ for the metabolite enantiomers. The recoveries were 61 and 55% for (*R*)-oxybutynin and (*S*)-oxybutynin, respectively and, for (*R*)-*N*-desethyloxybutynin and (*S*)-*N*-desethyloxybutynin 70 and 72%, respectively. Within-day and between-day assay precision and accuracy were lower than 15%. The method was applied to an *in vitro* biotransformation study using rat liver microsomal fraction. The kinetic constants were determined and there was a small difference in affinity of the enzyme for oxybutynin enantiomers ($K_m=9.3$ nmol L⁻¹ and 7.9 nmol L⁻¹ for (*R*)-oxybutynin and (*S*)-oxybutynin, respectively), with higher affinity to the (*S*)-oxybutynin according to the lower value of K_m .

Keywords: oxybutynin, *N*-desethyloxybutynin, enantioselective analysis, biotransformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de LPME	08
Figura 2.	Demonstração de microextração em fase líquida – Sistema de 2 fases	9
Figura 3.	Demonstração de microextração em fase líquida – Sistema de 3 fases	9
Figura 4.	Estruturas da Oxibutinina e de seu metabólito	13
Figura 5.	Esquema para otimização das condições de LPME	24
Figura 6.	Procedimento de isolamento da fração microssomal a partir do homogeneizado de fígado	34
Figura 7.	Representação de um gráfico de Lineweaver-Burk	37
Figura 8.	Cromatograma mostrando a separação dos enantiômeros da OXI (1 e 2), do cloridrato de propranolol (3 e 4) e da DEO (5 e 6) na coluna Chiralpak AD. Fase móvel hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3 % DEA, vazão 0,9 mL min ⁻¹ , 262 nm	39
Figura 9.	Espectros de dicroísmo, onde A : OXI 1, B : OXI 2, C : DEO 1 e D : DEO 2	39
Figura 10.	Procedimento de preparação das amostras para análise por HPLC, empregando plasma (A) ou fração microssomal (B)	41
Figura 11.	Superfície de resposta da área de OXI em função de agitação e teor de metanol	46
Figura 12.	Superfície de resposta da área de OXI em função de agitação e teor de NaCl	47
Figura 13.	Superfície de resposta da área de OXI em função de agitação e tempo	48
Figura 14.	Cromatogramas das amostras submetidas à extração, A corresponde ao branco de plasma, B ao branco da fração microssomal e C a amostra contendo OXI e DEO. Os picos 1 e 2 correspondem a (<i>R</i>)-OXI e (<i>S</i>)-OXI e os picos 3 e 4 a (<i>R</i>)-DEO e (<i>S</i>)-DEO. Fase móvel: hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão 0,9 mL min ⁻¹ , 262 nm	50

- Figura 15.** Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da OXI (intervalo de concentração plasmática de 312 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero) 52
- Figura 16.** Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da DEO (intervalo de concentração plasmática de 250 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero) 52
- Figura 17.** Cromatograma da amostra extraída após incubação. Os picos 1 e 2 correspondem a (*R*)-OXI e (*S*)-OXI e os picos 3 e 4 a (*R*)-DEO e (*S*)-DEO. Fase móvel hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão 0,9 mL min⁻¹, 262 nm. Condições de incubação: concentração de proteínas no meio de incubação: 0,4 mg mL⁻¹, concentração de cada enantiômero da OXI: 5 µg mL⁻¹, tempo de incubação: 3 minutos 59
- Figura 18.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função do tempo de incubação 60
- Figura 19.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da incubação da DEO com fração microsossomal de fígado de rato. Condições de incubação: concentração de proteína no meio de incubação de 1,0 mg mL⁻¹, concentração da DEO no meio de incubação: 10 µg mL⁻¹ de cada enantiômero 61
- Figura 20.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração de proteínas no meio de incubação 62
- Figura 21.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração da OXI no meio de incubação 63
- Figura 22.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função do tempo de incubação 64
- Figura 23.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração de proteínas no meio de incubação 65
- Figura 24.** Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função das diferentes concentrações de OXI no meio de incubação 66
- Figura 25.** Curva de Lineweaver-Burk para a (*R*)-OXI, onde $V_{\max} = 3,6$ nmol L⁻¹ (*R*)-DEO/ mg mL⁻¹ proteína/ min e $K_m = 9,3$ nmol L⁻¹ 67
- Figura 26.** Curva de Lineweaver-Burk para a (*S*)-OXI, onde $V_{\max} = 1,9$ nmol L⁻¹ (*S*)-DEO/ mg mL⁻¹ proteína/ min e $K_m = 7,9$ nmol L⁻¹ 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fatores estudados no Planejamento Fatorial Fracionado	25
Tabela 2.	Testes realizados no Planejamento Fatorial Fracionado	25
Tabela 3.	Níveis avaliados para cada fator estudado no Planejamento Composto Central	26
Tabela 4.	Ensaio realizado no Planejamento Composto Central	26
Tabela 5.	Procedimento para dosagem de proteínas	35
Tabela 6.	Valores das áreas dos picos da OXI e DEO nos cromatogramas obtidos com o Planejamento Fatorial Fracionado	43
Tabela 7.	Influência dos fatores avaliados pelo Planejamento Fatorial Fracionado na extração da OXI e DEO	43
Tabela 8.	Resumo da análise das variâncias observadas no PCC	45
Tabela 9.	Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da OXI e DEO em função das diferentes concentrações no meio de incubação	53
Tabela 10.	Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da OXI	55
Tabela 11.	Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da DEO	55
Tabela 12.	Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação para os enantiômeros da DEO	56
Tabela 13.	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	57
Tabela 14.	Estabilidade no tempo de análise	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP	glicoproteína ácida (<i>Acid Glycoprotein</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	dicroísmo circular (<i>Circular Dicroism</i>)
CV	coeficiente de variação
DEA	dietilamina
DEO	<i>N</i> -desetiloibutinina
CYP450	citocromo P450
E	erro relativo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
F	número F
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	grau de liberdade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	<i>Internacional Conference of Harmonization</i>
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LPME	Microextração em fase líquida com membrana porosa (<i>Liquid Phase Microextraction</i>)
n	número de determinações
NaCl	cloreto de sódio
NADP	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NRS	solução de incubação (<i>NADPH regenerating system</i>)
OXI	oxibutinina
p	probabilidade

PCC	Planejamento composto central
PI	padrão interno
QM	quadrado médio
rac	racêmico
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SQ	soma dos quadrados
UV-vis	ultra-violeta/visível

SUMÁRIO

RESUMO _____	i
ABSTRACT _____	ii
LISTA DE FIGURAS _____	iii
LISTA DE TABELAS _____	v
LISTA DE ABREVIATURAS _____	vi
1 – INTRODUÇÃO _____	1
1.1 Técnicas de preparação de amostras_____	2
1.1.1 Extração líquido-líquido_____	3
1.1.2 Extração em fase sólida_____	4
1.1.3 Microextração em fase sólida_____	5
1.1.4 Microextração em fase líquida com membrana porosa_____	7
1.2 Oxibutinina_____	11
1.2.1 Biotransformação enantiosseletiva da OXI_____	13
1.2.2 Análise enantiosseletiva da OXI e DEO_____	15
2 – OBJETIVOS _____	18
3 – MATERIAL E MÉTODOS _____	19
3.1 Metodologia de análise enantiosseletiva_____	19
3.1.1 Análise cromatográfica_____	19
3.1.1.1 Equipamentos_____	19
3.1.1.2 Reagentes e solventes_____	19
3.1.1.3 Coluna quiral e coluna de guarda_____	19
3.1.1.4 Soluções-padrão_____	20
3.1.1.5 Condições otimizadas para análise cromatográfica_____	20
3.1.1.6 Ordem de eluição_____	21

3.1.2	Preparação das amostras	21
3.1.2.1	Equipamentos	21
3.1.2.2	Reagentes e solventes	22
3.1.2.3	Amostras de plasma	22
3.1.2.4	Otimização das condições de extração por LPME	23
3.1.3	Validação do método	27
3.1.3.1	Curva analítica e linearidade	27
3.1.3.2	Recuperação	28
3.1.3.3	Precisão e exatidão	29
3.1.3.4	Limite de quantificação	30
3.1.3.5	Estabilidade durante o ciclo de congelamento	30
3.1.3.6	Estabilidade no tempo de análise	31
3.2	Estudo de biotransformação	31
3.2.1	Equipamentos	31
3.2.2	Reagentes e solventes	32
3.2.3	Animais	32
3.2.4	Aplicação do método	33
3.2.4.1	Isolamento da fração microssomal do fígado de ratos	33
3.2.4.1.1	Dosagem de proteínas	34
3.2.4.2	Procedimento de incubação	35
3.2.4.3	Determinação das constantes cinéticas	36
4	– RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Método de análise enantiosseletiva	38
4.1.1	Resolução dos enantiômeros	38
4.1.2	Ordem de eluição dos enantiômeros	39

4.1.3	Preparação das amostras	40
4.1.3.1	Otimização das condições da LPME	41
4.1.4	Validação	51
4.1.4.1	Linearidade	51
4.1.4.2	Recuperação	53
4.1.4.3	Precisão e exatidão	54
4.1.4.4	Limite de quantificação	56
4.1.4.5	Estabilidade	56
4.2	Aplicação do método	58
4.2.1	Otimização das condições de incubação	59
4.2.1.1	Tempo de incubação	59
4.2.1.2	Concentração de proteínas da fração microsomal	61
4.2.1.3	Concentração da OXI	62
4.2.2	Estudos de biotransformação	63
4.2.2.1	Tempo de incubação	64
4.2.2.2	Concentração de proteínas da fração microsomal	65
4.2.2.3	Determinação das constantes cinéticas	66
5	– CONCLUSÕES	70
6	– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO		79

1 – INTRODUÇÃO

Aproximadamente 56% dos fármacos são compostos quirais, sendo que 88% deles são empregados terapêuticamente na forma de racematos; isto se deve, principalmente, à falta de tecnologias de síntese apropriadas e a razões econômicas. Os isômeros *R* e *S* apresentam constituição idêntica, porém os diferentes grupos ocupam diferentes posições no espaço (diferente configuração), conseqüentemente, podem apresentar diferenças nas suas propriedades farmacocinéticas e nas suas atividades farmacodinâmicas (RENTSCH, 2002; TRIGGLE, 1997). Em relação à farmacodinâmica, é comum haver diferença de afinidade de cada enantiômero ao receptor, levando a diferentes potências. Em alguns casos, um dos enantiômeros pode ser praticamente inativo. Os enantiômeros podem também apresentar os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção de forma estereosseletiva, sendo que este efeito é mais pronunciado no processo de biotransformação, devido ao envolvimento do sistema enzimático (TINGLE; HELSBY, 2006).

Em função das características de disposição cinética e dinâmica estereosseletivas, a questão da quiralidade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos; por outro lado, os fármacos já comercializados como racematos também têm sido estudados para verificar se existem vantagens na produção como enantiômeros puros (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Para se ter conhecimento de como estes fármacos quirais se comportam no organismo após sua administração, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos para quantificar os enantiômeros separadamente em

materiais biológicos. No desenvolvimento desses métodos é necessário considerar não apenas a capacidade das técnicas analíticas empregadas na resolução dos enantiômeros, mas também a eficiência de procedimentos adequados de preparação das amostras (CALDWELL, 1996).

Este estudo visa avaliar a biotransformação *in vitro* da oxibutinina empregando a fração microssomal isolada de fígados de ratos. Para esta investigação foi necessário empregar método enantiosseletivo de análise usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a preparação das amostras utilizou-se uma nova e promissora técnica de microextração, a microextração em fase líquida com membrana porosa (LPME).

A oxibutinina foi selecionada para este estudo por apresentar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas estereosseletivas e devido à carência de metodologias para análise enantiosseletiva, principalmente no que se refere ao uso de técnicas de microextração.

1.1 Técnicas de preparação de amostras

Uma das etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas consiste na extração e no isolamento dos analitos de interesse, de forma que seja efetuada sua determinação qualitativa e quantitativa por intermédio de uma técnica analítica adequada.

Os materiais biológicos (soro, plasma, urina etc) são preparações complexas e comumente apresentam proteínas, sais, ácidos, bases e inúmeros outros compostos orgânicos. Adicionalmente, os analitos estão presentes nessas matrizes em pequenas quantidades (KATAOKA, 2003). Estas características dificultam a

identificação e quantificação do analito e, conseqüentemente, a análise cromatográfica de substâncias presentes neste tipo de matriz requer um pré-tratamento da amostra (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Este pré-tratamento tem como objetivos eliminar os interferentes e concentrar ou isolar o analito. Para esta finalidade são necessárias técnicas que sejam simples, baratas, rápidas, que empregam pequena ou nenhuma quantidade de solventes e, principalmente, sejam compatíveis com o instrumento analítico (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). As novas tendências apontam para a utilização de técnicas mais seletivas e automatizadas. Existem várias tecnologias para a extração e/ou concentração de compostos orgânicos em matrizes biológicas, sendo as principais: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase líquida com membrana porosa e microextração em fase sólida (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; PEDERSEN -BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

1.1.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE) é amplamente empregada e se baseia na partição dos analitos entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. É uma técnica simples, com grande diversidade de solventes disponíveis, com ampla faixa de solubilidade e seletividade. Porém, esta técnica apresenta algumas desvantagens: substâncias com alta afinidade pela água são apenas parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, pode ocorrer formação de emulsões, o tempo de extração é longo e são

necessários volumes grandes de solventes orgânicos, gerando problemas de descarte (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

1.1.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) é tradicionalmente usada na forma de cartuchos contendo um sorvente. Em geral os sorventes utilizados nesta técnica são semelhantes aos empregados em cromatografia líquida de alta eficiência (C18 e C8); carvão ativo, alumina, sílica gel, silicato de magnésio também são empregados. Após a eluição da amostra pelo cartucho, uma solução adequada é passada por ele para remover os interferentes e então, um solvente é empregado para eluir o analito de interesse. Devido à passagem de grandes volumes de água pelos cartuchos estes podem ser obstruídos, tornando o processo lento. Discos extratores em fase sólida, de introdução mais recente, admitem fluxos mais altos, o que diminui o tempo de extração, além de permitirem a passagem de maior volume de líquido e, assim, maior concentração dos analitos (NETO; SIQUEIRA, 2005). A SPE se desenvolveu muito nos últimos anos, principalmente com o desenvolvimento de novos sorventes com capacidade de melhorar a extração de compostos mais polares (NETO; SIQUEIRA, 2005). Apesar da SPE apresentar vantagens em relação aos métodos clássicos, tais como praticidade e maior seletividade, esta técnica tem algumas limitações. A dessorção do analito requer, geralmente, o emprego de solvente orgânico tóxico e o material empregado apresenta custo elevado (KATAOKA, 2003; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

1.1.3 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* - SPME) é uma técnica recente, introduzida em 1990 por Arthur e Pawliszyn. Suas aplicações mais comuns estão relacionadas a compostos orgânicos voláteis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, praguicidas e, mais recentemente, para análises ambientais, clínicas, forense e de alimentos (LORD; PAWLISZYN, 2000).

O dispositivo básico consiste de um bastão de sílica fundida de 100 µm de diâmetro, recoberto com um filme de polímero (Polidimetilsiloxano, Poliacrilato, Carbowax), de adsorvente (Carboxen, Divinilbenzeno) ou mista. Os recobrimentos apresentam espessura de 7 a 100 µm e seus volumes variam de 0,03 a 0,7 µL (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A técnica é baseada no estabelecimento de um equilíbrio de partição do analito entre a matriz e a fase extratora. A fibra pode ser mergulhada diretamente na matriz (modo direto) ou ser exposta ao “*headspace*” (“modo *headspace*”). O modo direto é aplicado a analitos não voláteis ou a matrizes não complexas; o modo “*headspace*” é aplicado a analitos de média ou alta volatilidade. Depois de finalizada a extração, a fibra é retraída e posteriormente introduzida no instrumento analítico onde os solutos podem ser desorvidos termicamente (Cromatografia Gasosa) ou dissolvidos pela fase móvel (HPLC). A desorção dos analitos da fibra também pode ser feita “*off-line*”, neste caso a fibra é deixada em contato com um solvente apropriado e, em seguida, o extrato obtido é analisado (THEODORIDIS; KOSTER; JONG, 2000; DIETZ; SANZ; CÁMARA, 2006).

Existem vários parâmetros que podem ser otimizados durante o desenvolvimento do método tais como: pH, força iônica, tipo de fibra, tempo e

temperatura de extração, agitação da amostra (THEODORIDIS; KOSTER; JONG, 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000).

✓ pH – o ajuste do pH da amostra é importante para analitos que podem estar na forma dissociada ou não. Melhores recuperações são obtidas quando estes compostos se encontram na sua forma neutra. O ajuste do pH deve ser cauteloso, principalmente se a técnica de extração for por imersão direta, pois valores extremos de pH podem deteriorar as fibras extratoras.

✓ Força iônica – a adição de eletrólitos em concentrações adequadas pode aumentar a recuperação através do processo de “*salting out*”.

✓ Tipo de fibra – existem diversas fibras disponíveis, que devem ser escolhidas segundo as características físico-químicas dos analitos de interesse. Estas fibras podem ser de fase ligada (Polidimetilsiloxano / Divinilbenzeno, Carbowax / Divinilbenzeno, etc) ou não (Polidimetilsiloxano), sendo que as fibras com fase ligada são mais estáveis aos solventes orgânicos e, portanto, são mais duráveis que as demais.

✓ Tempo – a extração por SPME é um processo de equilíbrio, ou seja, os analitos se distribuem entre a amostra e a fibra até que, após um determinado tempo, o equilíbrio é atingido. Após este tempo, a concentração dos analitos na fibra não é mais alterada. Entretanto, o controle do tempo de extração é essencial para se obter reprodutibilidade, caso a extração seja finalizada antes do equilíbrio ser atingido. Outros fatores agem afetando este equilíbrio como a agitação da amostra, espessura da fibra e temperatura.

✓ Temperatura – o aumento da temperatura influencia a extração do analito, acelerando o estabelecimento do equilíbrio de distribuição, aumentando, conseqüentemente sua recuperação. Por outro lado, diminui a afinidade do analito

pela fibra, diminuindo a eficiência da extração. Portanto, a temperatura ideal de extração deve ser estabelecida experimentalmente.

✓ Agitação da amostra – pode melhorar a recuperação e diminuir o tempo de extração do analito. A agitação pode ser aplicada por agitação magnética, sonicação, etc.

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens dentre elas; volumes de amostras e reagentes extremamente baixos, simplicidade, redução marcante do tempo de análise e possibilidade de automação (MUSTEATA; PAWLISZYN, 2006).

1.1.4 Microextração em fase líquida com membrana porosa

A microextração em fase líquida surgiu em 1996 (JEANNOT; CANTWELL, 1996), com o objetivo de reduzir o consumo de solventes orgânicos, facilitar a automação e reduzir o tempo de extração de analitos. O modelo inicial empregava uma microgota de um solvente orgânico suspendida na ponta da agulha de uma microseringa; esta microgota era mergulhada na matriz aquosa para que os analitos de interesse fossem transferidos da matriz para a microgota. Finalmente, a microgota era aspirada para dentro da microseringa e analisada.

Em função da limitação desta técnica, baixa robustez devido à possibilidade da gota se soltar da microseringa, Pedersen-Bjergaard & Rasmussen (1999) desenvolveram um novo modelo empregando uma membrana cilíndrica feita de polipropileno.

Na microextração em fase líquida com membrana porosa (*Liquid Phase Microextraction* - LPME) (Figura 1), a extração acontece devido à partição do analito entre uma fase doadora (amostra) e uma fase aceptora presente no interior de uma

membrana cilíndrica, hidrofóbica e porosa, através de um solvente orgânico presente nos poros dessa membrana. Atualmente existem várias publicações demonstrando a efetividade desta técnica, podendo ser aplicada a uma grande variedade de amostras, incluindo plasma, sangue, urina, saliva, dentre outras (KATAOKA, 2003; RASMUSSEN et al., 2000).

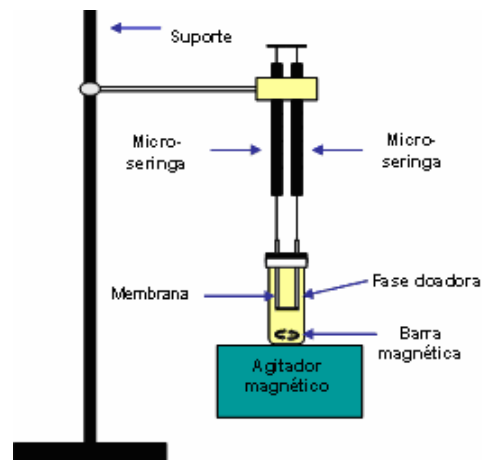


Figura 1 – Representação esquemática de LPME

Para esta técnica, a amostra deve ser uma solução aquosa com pH adequado, sendo que o volume usual é de 0,1 – 4 mL, dependendo da aplicação. O comprimento da membrana empregada varia de 1,5 – 8 cm (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). Antes da extração a membrana deve ser imersa em um solvente orgânico imiscível em água, para imobilizá-lo nos poros; o excesso de solvente deve ser removido, usualmente com água, pelo emprego de ultra-som. Posteriormente, as extremidades da membrana devem ser fixadas em duas microseringas (“Sistema em U”). Aplica-se a solução aceptora no interior da membrana, que pode ser igual ao solvente orgânico (sistema com 2 fases) (Figura 2)

ou uma solução aquosa (sistema com 3 fases) (Figura 3) (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Finalmente, mergulha-se a membrana (contendo a solução acceptora) na amostra e deixa-se em contato pelo tempo necessário para haver a extração. Depois de concluído o tempo de extração, a solução acceptora é retirada da membrana por uma das microseringas e pode ser diretamente analisada por HPLC ou eletroforese capilar (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; RASMUSSEN et al., 2000; ANDERSEN et al., 2002; SANTANA; OLIVEIRA; BONATO, 2005). Em função da dificuldade do manuseio de duas microseringas, foram desenvolvidos sistemas empregando apenas uma microseringa com a membrana fechada em uma das extremidades (LEE et al., 1997).

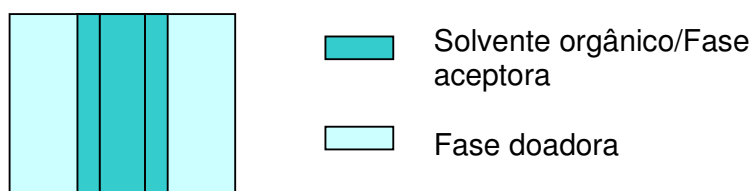


Figura 2 – Esquema da microextração em fase líquida com membrana porosa – Sistema de 2 fases

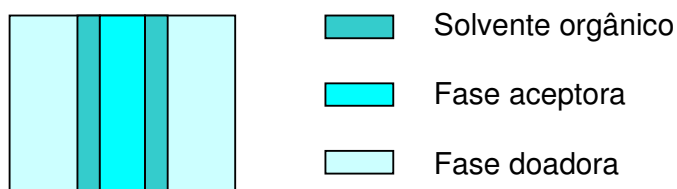


Figura 3 – Esquema da microextração em fase líquida com membrana porosa – Sistema de 3 fases

Existem vários parâmetros que podem ser otimizados durante o desenvolvimento do método tais como: ajuste do pH da amostra, adição de sal e

modificadores orgânicos na fase doadora, solvente orgânico, volume e pH da solução aceptora, tempo de extração, agitação da amostra (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN et al., 2000).

✓ pH – o pH está diretamente relacionado ao equilíbrio de dissociação, o que é fundamental para a extração de analitos ácidos e básicos. Estes compostos devem estar na sua forma não-ionizada para poderem ser transferidos para o solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana e presente no lúmen desta (sistema em duas fases). Quando o sistema em três fases é empregado, o pH da fase aceptora também deve ser controlado de tal forma a manter os analitos na forma dissociada.

✓ Adição de sal – a adição de sal pode aumentar a recuperação dos analitos através do efeito de “*salting out*”. Em concentrações elevadas pode diminuir a solubilidade do analito ou aumentar a viscosidade do meio, dificultando a difusão do analito. O cloreto de sódio é o sal mais empregado.

✓ Modificador orgânico – alguns fármacos se ligam fortemente às proteínas dos meios biológicos, dificultando sua extração. Estas interações podem ser iônicas, hidrofóbicas ou polares. Solventes orgânicos (metanol, acetonitrila, etc) são capazes de romper ligações hidrofóbicas e polares e tornar o analito disponível para ser extraído. Em contrapartida, podem alterar a distribuição do analito entre a fase aquosa (doadora) e a fase orgânica, prejudicando sua extração.

✓ Solvente orgânico – o solvente orgânico empregado em LPME deve apresentar baixa solubilidade ou insolubilidade em água, evitando a dissolução da fase orgânica na aquosa; compatibilidade com a membrana empregada; baixa volatilidade, para que não haja evaporação durante a extração e ser de fácil impregnação nos poros da membrana.

-
- ✓ Solução aceptora – nos sistemas de três fases, a fase aceptora deve ser uma solução aquosa de pH oposto ao da fase doadora. Isto é necessário para que os analitos fiquem carregados nesta fase, evitando sua retenção na fase orgânica.
 - ✓ Tempo – a LPME é um processo de transferência de massas, envolvendo a migração do analito da fase doadora para a fase orgânica e desta para a fase aceptora. É necessário um tempo adequado para que este sistema atinja o equilíbrio, ou seja, para que a distribuição do analito entre as fases permaneça constante. Da mesma forma que em SPME, a extração pode ser finalizada antes do equilíbrio ser atingido, e neste caso, o controle do tempo de extração é essencial.
 - ✓ Agitação da amostra – a agitação favorece a distribuição dos analitos entre as fases, acelerando a cinética de extração e, conseqüentemente, diminuindo o tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio do sistema. A agitação com barras magnéticas é o sistema mais empregado.
 - ✓ Membrana – a membrana empregada em LPME deve ser hidrofóbica e não interagir com o solvente orgânico empregado na extração. As membranas de polipropileno atendem a estes quesitos e são as mais utilizadas.

1.2 Oxibutinina

A oxibutinina (OXI) (Figura 4) é um fármaco quiral empregado na forma de racemato para o tratamento de incontinência urinária e outros distúrbios urológicos relacionados com a micção. Sua ação farmacológica inclui o bloqueio de receptores colinérgicos ou relaxamento direto do músculo detrusor, bem como um efeito analgésico local na mucosa vesical. Não se sabe exatamente em qual receptor muscarínico ela age, porém acredita-se que tenha maior afinidade pelos receptores

M3 (MIZUMA et al., 2003; KIM; HAN, 2003). Entre os efeitos da OXI, destacam-se a diminuição do tônus vesical, supressão de contrações involuntárias do detrusor e diminuição da frequência miccional. Contudo, clinicamente, o uso deste fármaco é muitas vezes limitado pelos efeitos adversos como boca seca, taquicardia, constipação intestinal e turvação visual, que estão presentes em 40% a 80% dos casos. Isto faz com que a OXI seja administrada em doses subterapêuticas ou até mesmo descontinuada (FREDERICKS; ANDERSON; KREULEN, 1975).

Smith et al. (1998) compararam os efeitos terapêuticos e tóxicos dos enantiômeros isolados da OXI e observaram que a (*S*)-OXI produz menor incidência de efeitos adversos antimuscarínicos, porém, também se verifica menor atividade terapêutica para esse enantiômero.

A OXI é rapidamente absorvida após administração oral, sendo que o pico de concentração plasmática é observado após 4 horas. Estudos demonstram que a OXI se liga extensivamente à α_1 -glicoproteína ácida (~98%), sendo maior afinidade desta proteína pela (*S*)-OXI (SHIBUKAWA et al., 2002).

Quando administrada por via oral, sofre biotransformação hepática pronunciada levando à formação de *N*-desetiloxibutinina (DEO) (Figura 4) (LUKKARI et al., 1998), que apresenta atividade anticolinérgica semelhante a do fármaco. Esse metabólito também contribui para o efeito adverso mais pronunciado da OXI, secura da boca, que leva muitos pacientes a desistirem do tratamento ou à necessidade de ajuste de dose. Este efeito adverso se dá devido à maior afinidade da DEO pelos receptores colinérgicos das glândulas parótidas (GUAY, 2003). Visando obter uma menor flutuação nas concentrações plasmáticas, preparações de liberação controlada também estão disponíveis no mercado. Considerando ainda que na administração oral, as concentrações plasmáticas do metabólito podem chegar a 4 a 10 vezes a

concentração do fármaco, formulações para administração transdérmica também foram desenvolvidas (APPEL et al., 2003; DAVILA, 2003; ZOBRIST et al., 2003; ZOBRIST et al., 2001; MASSOUD et al., 1999).

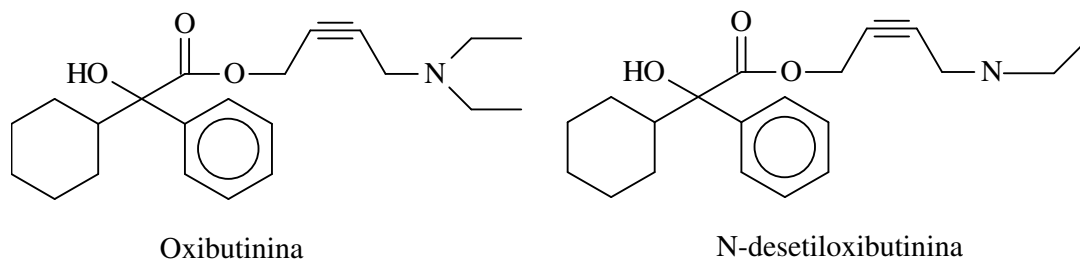


Figura 4 – Estruturas da Oxibutinina e de seu metabólito

1.2.1 Biotransformação enantiosseletiva da OXI

A influência da estereoquímica nas propriedades farmacocinéticas é marcante, principalmente a biotransformação de fármacos quirais, já que a interação com enzimas geralmente é estereoespecífica. A biotransformação envolve duas fases: fase I relacionada, principalmente, às enzimas do citocromo P450 (CYP450), compreendendo reações de oxidação, redução e hidrólise; e a fase II que compreende as reações de conjugação, que ocorrem pela ação de transferases (SAÚDE PÚBLICA, 2001). Nas células, as enzimas do sistema CYP450 podem se localizar no retículo endoplasmático, na mitocôndria, no citosol, nos lisossomas, ou mesmo no invólucro nuclear da membrana plasmática de inúmeros tecidos (MORGAN, 1997).

A superfamília de citocromo P450 catalisa numerosas reações, incluindo o metabolismo de ácidos graxos, a síntese e metabolismo de outros compostos

endógenos e a biotransformação de xenobióticos (GONZALEZ, 1988; JUCHAU, 1994).

As várias isoformas de CYP estão agrupadas nas subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 (OINONEN; LINDROS, 1998). As isoformas 1A1 e 1A2 são expressas em quantidades variadas, em diferentes tecidos, sendo que CYP1A1 apresenta grande correlação com a carcinogênese no pulmão. As isoformas, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 são altamente polimórficas e, embora estejam presentes em quantidades pequenas no fígado, são responsáveis pela biotransformação de aproximadamente 40% dos fármacos prescritos; CYP2E1, CYP2F1 e CYP2J2 também são citadas como isoformas auxiliares na biotransformação de alguns fármacos. A subfamília CYP3 apresenta quatro membros, sendo CYP3A4 e CYP3A5 as enzimas do CYP450 de maior expressão no fígado humano e no trato gastrointestinal. As enzimas dessa subfamília são também conhecidas por biotransformarem mais de 120 fármacos prescritos e substratos endógenos, tais como esteróides e ácidos biliares (NEBERT; RUSSEL, 2002).

Vários fatores contribuem para alterar os níveis e atividade destas isoformas, incluindo fatores genéticos, ambientais, fisiológicos, dieta, infecções e estímulos inflamatórios. Além destes, substâncias xenobióticas podem induzir ou inibir a atividade das isoformas (HALPERT et al., 1994).

Estudos anteriores indicam biotransformação estereosseletiva da OXI e confirmam que a CYP3A4 é a principal enzima envolvida na biotransformação deste fármaco (LUKKARI et al., 1998; MIZUSHIMA et al., 2007).

Zobrist et al. (2001) avaliaram a cinética da OXI após a administração, em humanos, de preparações por via oral e transdérmica. Verificaram que não há diferença significativa na absorção dos enantiômeros da OXI por via oral e

transdérmica; porém observaram maior biodisponibilidade da (S)-DEO no estudo com a preparação de administração transdérmica enquanto a biodisponibilidade da (R)-DEO foi maior no estudo com a preparação de uso oral.

Mizushima et al. (2007) avaliaram a biotransformação da OXI em estudo *in vitro* empregando fração microsomal humana e observaram maior afinidade enzimática à (S)-OXI.

Dentre todos os parâmetros cinéticos avaliados em estudos prévios, a ligação estereosseletiva dos enantiômeros da OXI às proteínas plasmáticas e a biotransformação estereosseletiva destes enantiômeros são apontados como os principais parâmetros responsáveis pela farmacocinética estereosseletiva deste fármaco (LUKKARI et al., 1998; ZOBRIST et al., 2001; ZOBRIST et al., 2003; MIZUSHIMA et al., 2007).

1.2.2 Análise enantiosseletiva da OXI e DEO

A análise enantiosseletiva da OXI e DEO em matrizes biológicas é descrita na literatura em apenas 3 trabalhos. Todos os autores empregaram fases estacionárias quirais e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para a quantificação dos enantiômeros.

Alebic-Kolbah & Zavitsanos (1997) propuseram a análise enantiosseletiva da OXI e DEO em plasma empregando coluna quiral baseada em derivado de amilose. As fases estacionárias baseadas em polissacarídeos, como a amilose, estão entre as mais utilizadas na resolução e quantificação de compostos quirais em fluidos biológicos devido à alta estabilidade e poder de resolução (YASHIMA; OKAMOTO, 1995). Estas fases estacionárias são preparadas pela adição de derivados de

celulose e amilose (derivados carbamatos, acetatos e benzoatos) em uma matriz de sílica gel. O mecanismo de interação quiral depende dos substituintes presentes na molécula do polissacarídeo, podendo ocorrer interações polares, interações π - π ou interações dipolo-dipolo (YASHIMA; OKAMOTO, 1995). Nas separações empregando as fases estacionárias baseadas em polissacarídeos, podem-se empregar como modos de eluição fase normal, fase reversa ou polar orgânica (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). Neste método, os enantiômeros da OXI e DEO foram separados usando uma coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, recoberta com partículas de 10 μ m) e empregando hexano: isopropanol (90:10, v/v) + 0,1% de dietilamina como fase móvel. A técnica de preparação de amostra empregada foi a LLE, usando clorobutano e acetato de etila como solventes extratores. Neste método, os autores obtiveram limites de quantificação de 0,15 e 0,75 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da OXI e DEO, respectivamente.

Zobrist et al. (2001) e Mizushima et al. (2007) empregaram coluna com fase estacionária quiral baseada em α_1 -glicoproteína ácida para a resolução dos enantiômeros da OXI e DEO em plasma. As fases estacionárias baseadas em proteínas podem ser preparadas a partir da proteína fisicamente adsorvida ou ligada covalentemente a um suporte, normalmente sílica. As proteínas mais usadas para a preparação dessas fases estacionárias são: albumina bovina, α_1 -glicoproteína ácida e proteína ovomucóide. São usadas com fases móveis aquosas tamponadas, juntamente com modificadores orgânicos (BONATO et al., 2002; HAGINAKA, 2002).

Zobrist et al. (2001) empregaram coluna Chiral AGP (150 x 2 mm, recoberta com partículas de 5 μ m) e tampão fosfato 10 mM e acetonitrila (10:90, v/v) como fase móvel. As amostras foram preparadas por LLE empregando hexano como solvente extrator. Neste método verificaram-se limites de quantificação de 0,5 e 75

ng mL⁻¹ para os enantiômeros da OXI e DEO, respectivamente. Mizushima et al. (2007) obtiveram limites de quantificação de 0,075 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da OXI e DEO empregando coluna semelhante e tampão acetato 10 mM e acetonitrila (89:11, v/v) como fase móvel. A técnica de preparação das amostras foi a SPE, utilizando solução de hidróxido de amônio em metanol para a eluição dos analitos.

Todos os métodos descritos apresentam alta detectabilidade, porém empregam a LLE e SPE como técnicas de preparação de amostra. Como já mencionado anteriormente, essas técnicas empregam grandes volumes de solventes orgânicos, por isto o interesse em desenvolver um novo método, principalmente no que se refere à técnica de preparação de amostras biológicas da OXI e DEO.

2 - OBJETIVOS

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise enantiosseletiva de OXI e DEO em fração microsomal de fígado de rato empregando a LPME como técnica de preparação das amostras.
 - Aplicação da nova metodologia em um estudo de biotransformação *in vitro* da OXI.
-

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metodologia de análise enantiosseletiva

3.1.1 Análise cromatográfica

3.1.1.1 Equipamentos

Foi utilizado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba de duplo pistão, modelo LC-10AT-VP, um injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA), modelo 7125 com amostrador de 50 μ L, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A VP, e um integrador modelo CR6-A. Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no equipamento da Jasco, modelo CD-1595 (Tóquio, Japão).

3.1.1.2 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados (grau cromatografia) foram etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), hexano (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA.) e isopropanol (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA). Dietilamina (DEA) grau p.a. (Fluka, Buchs, Suíça) foi empregada como aditivo básico.

3.1.1.3 Coluna quiral e coluna de guarda

Para a resolução dos enantiômeros da OXI e DEO foi utilizada uma coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μ m de diâmetro. Foi empregada a coluna de guarda NH₂ LiChroCart 100 (4 x 4

mm, Merck, Darmstadt, Alemanha), constituída de partículas de 5 µm de diâmetro de sílica modificada com grupos aminonopropil.

3.1.1.4 Soluções-padrão

Os padrões de *rac*-OXI e *rac*-DEO foram gentilmente cedidos por Watson Laboratories (Corona, CA, EUA) e Orgamol (Florham Park, NJ, EUA), respectivamente. As soluções de OXI e DEO foram preparadas separadamente, em metanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹ do racemato, dissolvendo-se 10 mg do sal em balão volumétrico de 10 mL. Soluções-padrão de OXI nas concentrações de 12,5, 16, 25, 50, 100, 140 e 200 µg mL⁻¹ de cada enantiômero foram obtidas por diluições apropriadas. Foram preparadas, de forma similar, soluções-padrão do metabólito nas concentrações de 10, 13, 20, 40, 100, 140 e 200 µg mL⁻¹ de cada enantiômero. Todas essas soluções foram utilizadas na otimização das condições de separação dos enantiômeros e na validação do método. Na otimização do método de extração empregou-se uma solução-padrão na concentração de 100 µg mL⁻¹ de cada enantiômero. As soluções foram estocadas em fracos âmbar a -20°C.

3.1.1.5 Condições otimizadas para a análise cromatográfica

Coluna: Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, partículas de 10 µm).

Coluna de guarda: NH₂ LiChroCart 100 (4 x 4 mm, partículas de 5 µm).

Fase móvel: hexano: isopropanol: etanol 95:4:1 (v/v/v) com 0,3% de DEA.

Vazão da fase móvel: 0,9 mL min⁻¹.

Comprimento de onda para detecção: 262 nm.

Volume de injeção: 50 μL .

Fase móvel para lavagem e estocagem da coluna: hexano: isopropanol 9:1 (v/v)

Entre as análises, o injetor e a seringa foram lavados com solução de hexano: isopropanol 9:1 (v/v) para eliminar resíduos dos analitos.

3.1.1.6 Ordem de eluição

Os enantiômeros da OXI e DEO foram separados e coletados conforme as condições cromatográficas descritas em 3.1.1.5, sendo denominados como OXI 1 e 2, DEO 1 e 2. Para se determinar a ordem de eluição, as frações coletadas foram evaporadas a securo, os resíduos foram dissolvidos na fase móvel e em seguida, foram obtidos os espectros de dicroísmo circular (CD) no intervalo de 205 – 450 nm.

As frações contendo os enantiômeros isolados também foram analisadas empregando a coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm) e hexano: isopropanol (90:10, v/v) + 0,1% de DEA como fase móvel, vazão de 1,0 mL min^{-1} , conforme proposto por Alebic-Kolbah & Zavitsanos (1997).

3.1.2 Preparação das amostras

3.1.2.1 Equipamentos

Para a realização dos experimentos empregando a LPME foram utilizados agitadores magnéticos (Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), suporte tipo haste comum e microseringas (50 μL e 250 μL , Hamilton, Reno, NV, EUA).

Para as aferições de pH das soluções aquosas foi empregado o pHmetro Corning, modelo 430 (Nova Iorque, NY, EUA). Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções.

3.1.2.2 Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) empregados na preparação das soluções foram fosfato monossódico monohidratado e fosfato dissódico dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio e ácido perclórico (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), ácido trifluoracético (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido acético (Chemco, Campinas, SP, Brasil). Os solventes grau p.a. empregados na membrana foram éter n-hexílico (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, EUA) e 1-octanol (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

As extrações foram feitas empregando-se membrana hidrofóbica de 6 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm , espessura de 200 μm e poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Wuppertal, Alemanha).

Cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e metanol (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA), grau p.a. e cromatografia, respectivamente foram utilizados para a avaliação dos parâmetros que influenciam a recuperação em LPME.

3.1.2.3 Amostras de plasma

Para minimizar o uso de animais, empregou-se plasma humano durante o desenvolvimento e validação do método ao invés de fração microssomal isolada de

fígado de ratos. Visando obter concentração de proteína similar à utilizada em misturas microssomais de incubação, empregaram-se 17 μ L de plasma para 1 mL de meio de incubação. Para confirmar a possibilidade de emprego do plasma substituindo a mistura microssomal, ambos foram avaliados nas condições cromatográficas estabelecidas em 3.1.1.5.

As amostras de plasma humano utilizadas durante o desenvolvimento e validação do método foram obtidas no hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.1.2.4 Otimização das condições de extração por LPME

Inicialmente determinou-se o solvente orgânico, tamanho da membrana e fase aceptora que seriam empregados; posteriormente, foram empregados planejamentos experimentais para se obter a condição otimizada do procedimento de extração (Figura 5).

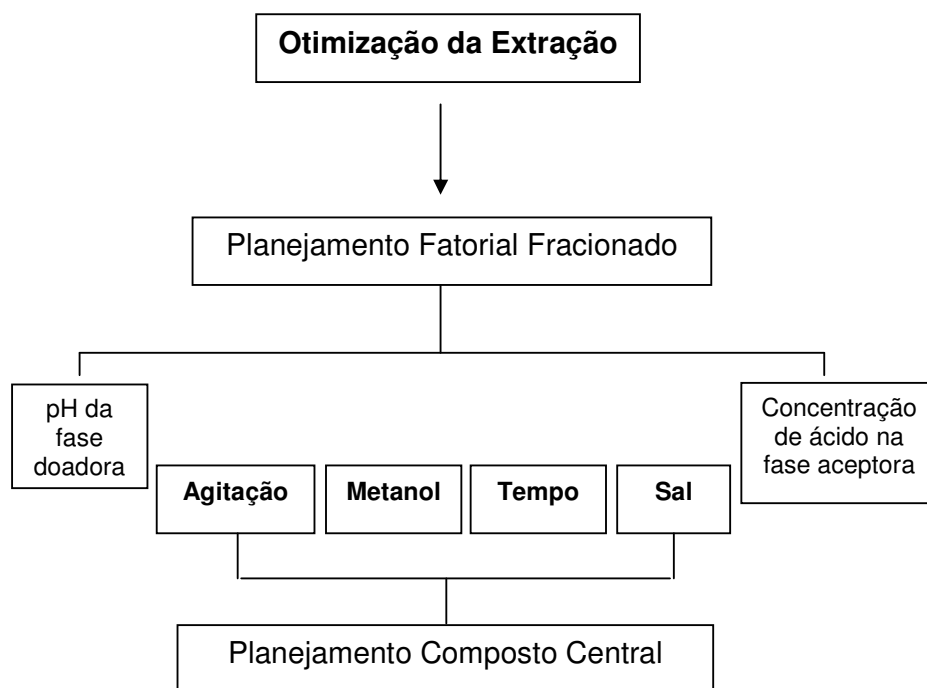


Figura 5 - Esquema para otimização das condições de LPME

Em função da grande quantidade de variáveis no procedimento de extração, inicialmente foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionado com 6 fatores: pH da fase doadora, concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra, quantidade de metanol e sal na fase doadora e tempo de extração (Tabelas 1 e 2). Este estudo preliminar foi realizado com o objetivo de verificar quais fatores influenciam mais significativamente a extração dos analitos. Para isto foram realizados 8 ensaios em duplicata.

Tabela 1 – Fatores estudados no Planejamento Fatorial Fracionado

Fator	Nível	
	Baixo	Alto
Tempo de extração (min)	20 (A)	40 (a)
Concentração de ácido na fase aceptora (mol L ⁻¹)	0,05 (B)	0,2 (b)
Quantidade de metanol (%)	0 (C)	5% (c)
Velocidade da agitação (rpm)	1500 (D)	4500 (d)
NaCl (%)	0 (E)	20% (e)
pH da fase doadora	7 (F)	8 (f)

Tabela 2 – Testes realizados no Planejamento Fatorial Fracionado

Fator	Combinação							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	b	B	b	B	b	B	b
C ou c	C	C	c	c	c	c	C	C
D ou d	D	d	D	d	d	D	d	D
E ou e	E	e	e	E	E	e	e	E
F ou f	F	f	f	F	f	F	F	F
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Os resultados foram avaliados, conforme a equação abaixo, através das diferenças (em módulo) das médias das áreas dos níveis baixos (ensaios com níveis baixos) com as médias das áreas dos níveis altos (ensaios com níveis altos) para cada fator, sendo considerados os valores mais altos como mais significativos.

$$\text{Fator} = \text{Média das áreas do nível baixo} - \text{Média das áreas do nível alto}$$

Em função dos resultados obtidos no Planejamento Fatorial Fracionado, foi desenvolvido um novo estudo, através do Planejamento Composto Central (PCC), visando definir qual a melhor condição de extração. O PCC foi delineado

empregando-se os 4 fatores: agitação da amostra, quantidade de metanol e sal na fase doadora e tempo de extração (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Níveis avaliados para cada fator estudado no Planejamento Composto Central

Níveis	Tempo* (X1)	% Metanol (X2)	Agitação** (X3)	% NaCl (X4)
- α	14,5	1,87	1500	2,25
-1	20	2,98	2000	5,00
0	30	5,00	3000	10,00
1	40	7,02	4000	15,00
α	45,5	8,13	4500	17,75

* Expresso em minutos

** Expresso em rotações por minuto (rpm)

Tabela 4 – Ensaios realizados no Planejamento Composto Central

Experimento	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	- α	0	0	0
21	α	0	0	0
22	0	- α	0	0
23	0	α	0	0
24	0	0	- α	0
25	0	0	α	0
26	0	0	0	- α
27	0	0	0	α

Para reduzir os cálculos nos ensaios do planejamento experimental, foi considerada como área da OXI e DEO a soma das áreas dos enantiômeros 1 e 2.

Para avaliação dos resultados do PCC foi empregado o módulo "General Linear Model" do software "Statistica 99 Edition - Kernel release 5.5" da Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA.

3.1.3 Validação do método

3.1.3.1 Curva analítica e linearidade

Para obtenção da curva analítica, alíquotas de 25 μL das soluções-padrão racêmicas de OXI e DEO foram transferidas, em duplicata, para frascos de 4 mL. O metanol foi eliminado por evaporação sob fluxo de ar comprimido e, em seguida, adicionou-se o plasma e tampão fosfato 1 mol L^{-1} pH 7,4 até volume de 1 mL (mistura denominada meio de incubação, similar ao meio empregado nas incubações com a fração microssomal). As concentrações dos enantiômeros da OXI e da DEO no meio de incubação foram 312, 625, 1250, 2500, 5000 e 250, 500, 1000, 2500, 5000 ng mL^{-1} , respectivamente. As amostras foram extraídas e analisadas.

Foram construídas curvas analíticas relacionando as concentrações dos enantiômeros *versus* as alturas dos picos, sendo que as concentrações dos enantiômeros nas amostras foram determinadas através da regressão linear.

3.1.3.2 Recuperação

Para avaliar a eficiência da extração, foram analisadas inicialmente (em triplicata) 3 concentrações de amostras não submetidas a extração. Para tanto foram empregadas alíquotas de 25 µL das soluções-padrão de OXI nas concentrações de 16, 50 e 140 µg mL⁻¹ de cada enantiômero, o que corresponde a concentrações de 400, 1250 e 3500 ng mL⁻¹ de meio de incubação e de DEO nas concentrações de 13, 40 e 140 µg mL⁻¹ de cada enantiômero, o que corresponde a concentrações de 325, 1000 e 3500 ng mL⁻¹ de meio de incubação. Estas soluções foram transferidas para tubos cônicos, o solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos na fase móvel e analisados. Em seguida, alíquotas do meio de incubação fortificadas com concentrações idênticas às anteriores foram analisadas após terem sido submetidas ao processo de extração.

A recuperação foi calculada usando a relação das alturas das amostras extraídas e não extraídas (ANVISA, 2003):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Altura dos picos na amostra submetida à extração}}{\text{Altura dos picos na amostra não submetida à extração}} \times 100$$

Foram calculados as estimativas dos desvios padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) para cada concentração.

3.1.3.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. As amostras foram fortificadas com OXI nas concentrações de 400, 1250 e 3500 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação; para a DEO, as concentrações foram de 325, 1000 e 3500 ng mL⁻¹ de cada enantiômero.

Para os estudos de precisão e exatidão intra-ensaio, cinco alíquotas de cada concentração foram analisadas no mesmo dia. Para os estudos da precisão e exatidão interensaios, foram consideradas 3 concentrações diferentes, em quintuplicata, em 3 dias diferentes. A concentração dos analitos nas amostras foram determinadas a partir de curvas da OXI e DEO preparadas diariamente nas mesmas condições descritas em 3.1.3.1.

A precisão é expressa como estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação (ANVISA, 2003):

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

DP é a estimativa do desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A exatidão é expressa em porcentagem do erro relativo, através da equação (QUATTROCCHI; ANDRIZZI; LABA, 1992):

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

3.1.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi avaliado apenas para os enantiômeros da DEO, visto que eram esperadas altas concentrações da OXI nos estudos de biotransformação.

Para avaliação dos limites de quantificação, 5 amostras do meio de incubação fortificadas com 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da DEO foram submetidas ao processo de extração e analisadas. As concentrações dos analitos nas amostras foram determinadas a partir da curva analítica da DEO preparada nas mesmas condições descritas em 3.1.3.1.

3.1.3.5 Estabilidade durante ciclo de congelamento

O estudo de estabilidade da OXI e DEO foi avaliado realizando-se 3 ciclos de congelamento e descongelamento, empregando-se 3 amostras na concentração baixa (16 e 13 µg mL⁻¹, de cada enantiômero da OXI e DEO, respectivamente) e 3 amostras na concentração alta (140 µg mL⁻¹, de cada enantiômero).

Neste estudo, as amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas e então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C, por 12 horas, e

assim, sucessivamente, até completar os três ciclos, quantificando-se a OXI e DEO nas amostras após o terceiro ciclo. Os valores de altura dos picos foram comparados com valores obtidos de amostras frescas e a análise estatística foi realizada utilizando o Teste *t* student (programa Origin 5.0) considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.1.3.6 Estabilidade no tempo de análise

Para este estudo também foram empregadas 3 amostras das concentrações baixa e alta, as quais foram submetidas ao descongelamento natural, a temperatura ambiente e mantidas durante 12 horas sobre a bancada de trabalho. Após este tempo, as amostras foram quantificadas e novamente os valores foram comparados com valores obtidos de amostras frescas; a análise estatística foi realizada utilizando o Teste *t* student (Origin 5.0) considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2 Estudo de biotransformação

3.2.1 Equipamentos

Um homogeneizador do tipo “Potter”, modelo MA 181 (Marconi, São Paulo, SP, Brasil) foi empregado para a homogeneização dos fígados dos animais. Para as centrifugações empregou-se centrífuga modelo HIMAC CF 15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) e ultra-centrífuga Beckman, modelo XL-70 (Fullerton, CA, EUA). A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada em um espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS™ (Spectronic instruments, Nova Iorque, NY, EUA). As

incubações foram realizadas em banho-maria com agitação, modelo MA093 (Marconi, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.2 Reagentes e solventes

O HEPES empregado na preparação de tampão foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As substâncias β -Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP), glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Foi empregado cloreto de potássio da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico da Chemco (Campinas, SP, Brasil), glicerol e tris (base) (hidroximetil)aminometano da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Carlo Erba (Milão, Itália). Para a determinação de proteínas totais na fração microssomal e no plasma foi utilizado KIT Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil) contendo padrão de soro-albumina bovina e solução de biureto.

3.2.3 Animais

Os animais (ratos Wistar machos, pesando de 180 a 200 g) foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, classificação SPF (*Specific Pathogen Free*). Segue anexada uma cópia do documento de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

3.2.4 Aplicação do método

3.2.4.1 Isolamento da fração microsomal do fígado de ratos

Os animais, ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12 horas foram submetidos a jejum na noite anterior aos experimentos. O fígado foi retirado (após decaptação), picado em pequenos pedaços e lavado com solução tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹ pH 7,4. Em seguida, o fígado foi adicionado de aproximadamente 20 mL de tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹ pH 7,4 e triturado em homogeneizador tipo “Potter” em 3 ciclos, sendo que cada ciclo compreende 3 triturações de um minuto com velocidade de 1000 rpm. Posteriormente, houve o isolamento da fração microsomal de acordo com o procedimento representado na Figura 6 (LAKE, 1987).

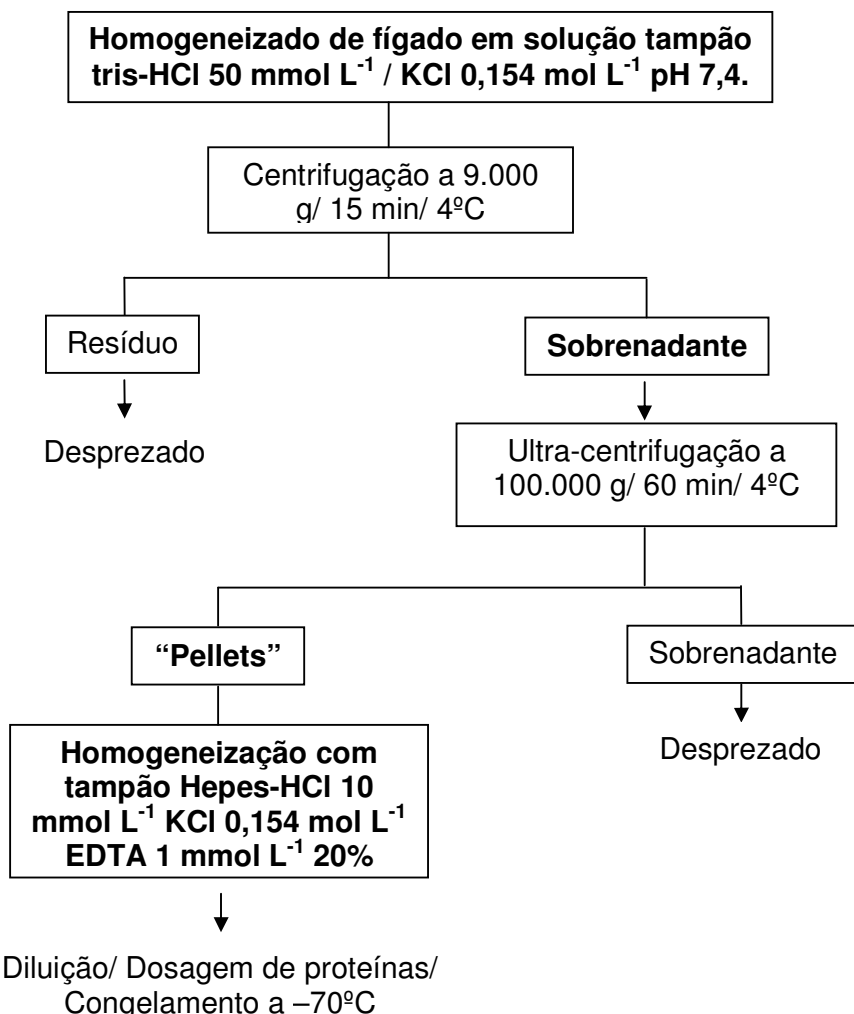


Figura 6 – Procedimento de isolamento da fração microsomal a partir do homogeneizado de fígado

3.2.4.1.1 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas na fração microsomal e no plasma foi determinada segundo o método de determinação de proteínas totais e o procedimento está representado na Tabela 5.

Tabela 5 – Procedimento para dosagem de proteínas

	Branco	Teste	Padrão
Água destilada	20 µL	-----	-----
Amostra	-----	20 µL	-----
Padrão ^a	-----	-----	20 µL
Biureto ^b	1000 µL	1000 µL	1000 µL

^a Soro-albumina bovina

^b Sulfato de cobre pentahidratado 0,15% e tartarato de sódio e potássio 0,6% em hidróxido de sódio 0,75 mol L⁻¹

Após o preparo, as amostras foram homogeneizadas e deixadas por 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 545 nm. A concentração de proteínas foi calculada segundo as equações:

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} \quad C_t = F_c \times A_t \times 10 \text{ (proteínas em mg mL}^{-1}\text{)}$$

Onde F_c é o Fator de correção, C_p concentração de proteínas do padrão, A_p absorbância do padrão, C_t concentração de proteínas do teste e A_t absorbância do teste.

3.2.4.2 Procedimento de incubação

Para a incubação foram utilizados tubos âmbar com tampa. Inicialmente a solução da OXI era adicionada aos tubos e o metanol era evaporado a secura sob fluxo de ar comprimido. Posteriormente, adicionava-se 250 µL da solução de incubação (NRS - *NADPH regenerating system*) contendo NADP, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase em solução tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹ / KCl 0,154

mol L⁻¹ pH 7,4, resultando em concentrações no meio de incubação de 1,7 mg mL⁻¹, 7,8 mg mL⁻¹ e 1,5 unidades, respectivamente. Finalmente, a fração microsomal do fígado de rato era acrescentada e completava-se o volume do meio de incubação (1 mL) com tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 7,4. A incubação era realizada sob agitação a 37⁰C. Depois de decorrido o tempo de incubação, a reação era encerrada com a adição de 400 µL de ácido perclórico 6% (v/v).

Foram otimizados o tempo de incubação, a concentração de proteínas na fração microsomal e a concentração da rac-OXI empregada. Inicialmente foram empregados 10 µL da solução da OXI 1,0 mg mL⁻¹, 68 µL da fração microsomal (concentração no meio de incubação de 1,0 mg mL⁻¹) e o tempo de incubação foi variado (5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min). Posteriormente variou-se a concentração de proteínas da fração microsomal no meio de incubação (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹) e por último a concentração da solução da OXI, sendo empregados 10 µL das soluções 0,2, 0,4, 1,0 mg mL⁻¹ e 20 µL da solução 1,0 mg mL⁻¹.

3.2.4.3 Determinação das constantes cinéticas

A equação de Michaelis-Menten é a equação de velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente com apenas um substrato.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Onde V_0 é a velocidade inicial, V_{\max} a velocidade máxima, K_m a constante de Michaelis-Menten e $[S]$ a concentração do substrato.

A equação pode ser algebricamente rearranjada em formas que são mais úteis no tratamento gráfico dos dados experimentais, sendo uma transformação muito empregada a inversão dos dois lados da equação, obtendo-se então gráficos de $1/v$ por $1/[S]$ (Lineweaver-Burk) (Figura 7), que permitem a obtenção das constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m e V_{max}), de forma mais precisa.

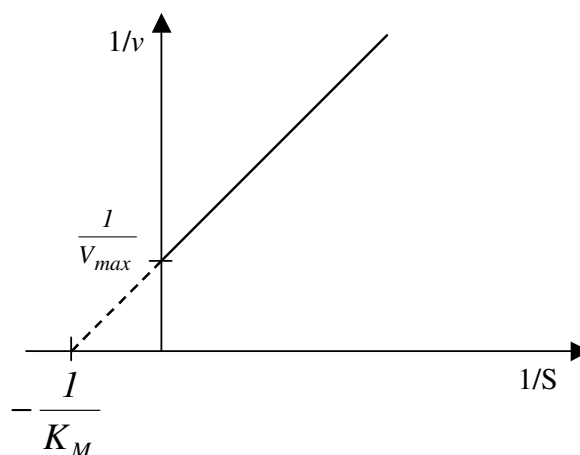


Figura 7 – Representação de um gráfico de Lineweaver-Burk.

Os cálculos das constantes cinéticas (K_m e V_{max}) envolvidas na biotransformação da OXI foram obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de Lineweaver-Burk.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método de análise enantiosseletiva

4.1.1 Resolução dos enantiômeros

A resolução dos enantiômeros da OXI e DEO em fluidos biológicos é descrita na literatura em apenas 3 trabalhos. Todos os autores fazem uso de colunas quirais baseadas em derivados de amilose (ALEBIC-KOLBAH; ZAVITSANOS, 1997) e α_1 -glicoproteína ácida (ZOBRIST et al., 2001; MIZUSHIMA et al., 2007).

Inicialmente, tentou-se a separação dos enantiômeros da OXI e DEO empregando uma coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm) e hexano: isopropanol (90:10, v/v) + 0,1% de DEA como fase móvel, na vazão de 1,0 mL min^{-1} , conforme procedimento descrito por Alebic-Kolbah & Zavitsanos (1997). Nesta etapa pretendia-se utilizar cloridrato de propranolol como padrão interno, por ser um fármaco de caráter básico e que teve comportamento similar a OXI e DEO durante a extração. Entretanto, não foi possível obter a separação simultânea da OXI, DEO e cloridrato de propranolol na condição acima. Após algumas variações na fase móvel e vazão, separação adequada foi obtida empregando-se hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% de DEA, numa vazão de 0,9 mL min^{-1} (Figura 8). Sob estas condições, o tempo para a eluição dos enantiômeros da OXI, DEO e cloridrato de propranolol foi de aproximadamente 21 min. O comprimento de onda que não demonstrou interferentes em amostras de branco de plasma ou fração microssomal e que propiciou uma detectabilidade adequada do fármaco, metabólito e padrão interno foi 262 nm.

Na análise dos extratos das amostras foi empregada a coluna de guarda NH_2 LiChroCart 100.

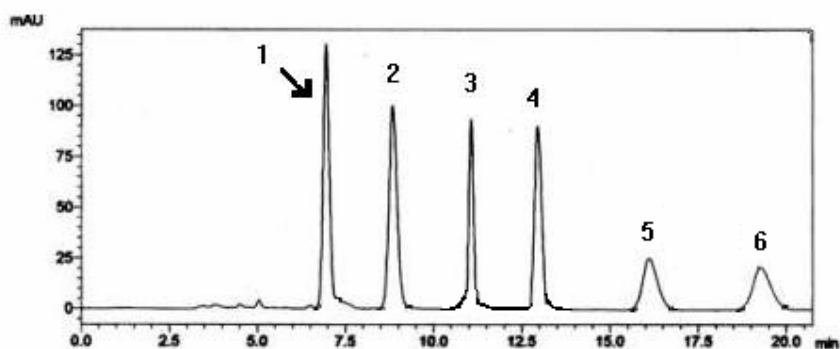


Figura 8 – Cromatograma mostrando a separação dos enantiômeros da OXI (1 e 2), do cloridrato de propranolol (3 e 4) e da DEO (5 e 6) na coluna Chiralpak AD. Fase móvel hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, 262 nm

4.1.2 Ordem de eluição dos enantiômeros

A Figura 9 mostra os espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da OXI e DEO. O resultado observado foi semelhante ao descrito por Miyamoto et al. (1993), o qual analisou os espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da OXI empregando hexano: isopropanol (90:10, v/v) como solvente de diluição.

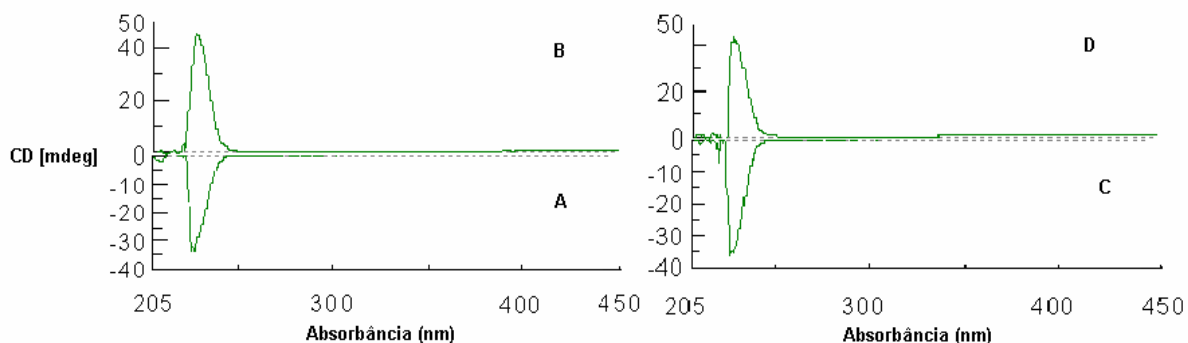


Figura 9 – Espectros de dicroísmo, onde **A**: OXI 1, **B**: OXI 2, **C**: DEO 1 e **D**: DEO 2

Segundo o método descrito por Alebic-Kolbah & Zavitsanos (1997), os enantiômeros OXI 1 e DEO 1 no cromatograma correspondem à forma (*R*) e os enantiômeros OXI 2 e DEO 2 correspondem à forma (*S*). Inicialmente a OXI e DEO foram analisadas como racematos para verificar se havia a reprodução do cromatograma e, posteriormente, os enantiômeros obtidos empregando o método proposto neste estudo foram analisados isoladamente. Verificou-se a mesma ordem de eluição, sendo que OXI 1 e DEO 1 do método descrito em 3.1.1.5, correspondem à OXI 1 e DEO 1 do método descrito por Alebic-Kolbah & Zavitsanos (1997), ou seja à forma (*R*). De maneira análoga OXI 2 e DEO 2 correspondem à forma (*S*).

Estes resultados mostram que OXI 1 e DEO 1 são (*R*)-OXI e (*R*)-DEO, respectivamente, e OXI 2 e DEO 2 são (*S*)-OXI e (*S*)-DEO, respectivamente.

4.1.3 Preparação das amostras

Materiais biológicos são produtos complexos que apresentam proteínas e demais compostos orgânicos. Os analitos frequentemente estão presentes em quantidades muito baixas nestas amostras, sendo necessário, conseqüentemente, um pré-tratamento para a extração, concentração ou isolamento destas substâncias (KATAOKA, 2003). O objetivo final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com os analitos de interesse, a fim de obter-se uma separação cromatográfica livre de interferentes (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Neste trabalho a LPME foi empregada como técnica de preparação das amostras. Esta técnica é relativamente nova, porém tem se mostrado bastante eficiente na concentração de analitos, além de empregar pequenos volumes de solventes (KATAOKA, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN -BJERGAARD, 2004).

A Figura 10 descreve como foram preparadas as amostras para a extração por LPME.

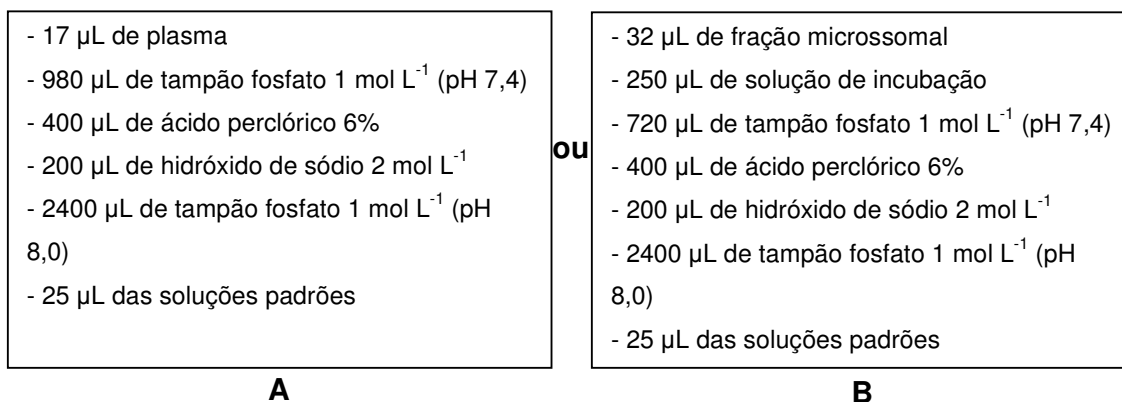


Figura 10 – Procedimento de preparação das amostras para análise por HPLC, empregando plasma (A) ou fração microssomal (B)

A adição de ácido perclórico 6% teve por finalidade encerrar o processo de biotransformação da OXI, ficando a amostra acidificada até pH 2,0; posteriormente o pH foi novamente aumentado para pH 8,0, utilizando-se 0,2 mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e tampão fosfato 1 mol L^{-1} (pH 8,0).

4.1.3.1 Otimização das condições da LPME

Em LPME, a seleção do solvente orgânico é fundamental na obtenção de recuperações adequadas; ele deve ser imiscível em água, apresentar baixa volatilidade, apresentar compatibilidade com a membrana e possuir afinidade pelo analito (LEE et al., 1997). Inicialmente o 1-octanol foi avaliado, com o qual não houve extração. Em seguida, testou-se o éter n-hexílico que proporcionou alguma extração da OXI e DEO, por este motivo, este solvente foi selecionado para os

testes posteriores. Em LPME, a membrana empregada na extração deve estar totalmente imersa na fase doadora, neste caso, com volume final de 4 mL; portanto, o tamanho da membrana necessário foi de 6 cm.

Para a extração de fármacos com caráter básico por LPME em três fases é necessário que o pH da fase doadora seja ajustado para manter os analitos na forma não-ionizada e o pH da fase aceptora seja ajustado para manter os analitos na forma ionizada, ou seja, a fase doadora deve ser alcalina e a fase aceptora ácida. Como fase aceptora foram testados ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹, ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e ácido trifluoracético 0,1 mol L⁻¹, sendo que o último foi o único que possibilitou a extração da OXI e DEO.

Estabelecidas estas condições iniciais partiu-se para um estudo de planejamento fatorial para avaliar os demais fatores que poderiam influenciar o processo de extração. Este estudo é interessante quando se deseja avaliar a influência de vários fatores em determinado processo, uma vez que fornece informações mais precisas da relação destes fatores entre si, além de requerer um número reduzido de análises. Como o número de fatores a ser investigado é grande, optou-se por planejamentos fracionados, os quais permitem obter as informações úteis através de um número reduzido de experimentos.

Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade de resultados, redução do tempo de análise e dos custos envolvidos (FERREIRA et al., 2007; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Na Tabela 6 são mostrados os valores das áreas obtidas para a OXI e DEO nos 8 ensaios realizados. Verificou-se que 5 fatores influenciam mais significativamente a extração da OXI e DEO da amostra: agitação da amostra, quantidade de metanol e sal na fase doadora, tempo de extração e pH da fase

doadora (Tabela 7). Cabe lembrar que as áreas dos dois enantiômeros de cada composto foram somadas, visando reduzir a quantidade de cálculos a serem realizados. Isto é possível porque o processo de extração não é enantiosseletivo e foram empregadas soluções do racemato para a realização dos testes.

Tabela 6 – Valores das áreas dos picos da OXI e DEO nos cromatogramas obtidos com o Planejamento Fatorial Fracionado

Combinações	Resultados	Área OXI	Área DEO
1	s	25896	17919
2	t	13848	11435
3	u	13274	9723
4	v	36599	13422
5	w	41968	35874
6	x	43935	20886
7	y	34917	1997
8	z	29137	24042

Tabela 7 - Influência dos fatores avaliados pelo Planejamento Fatorial Fracionado na extração da OXI e DEO

Fator	OXI	DEO
	<i>Diferenças das médias dos níveis altos e baixos.</i>	
Tempo	-15084	-7574
Fase aceptora	-1865	-1067
Metanol	-7994	-6127
Agitação	-3772	2460
NaCl	6906	33824
pH da fase doadora	10780	-6712

Em função dos resultados obtidos no primeiro Planejamento Fatorial Fracionado foi utilizado um PCC de quatro fatores, o qual permitiu verificar a influência dos fatores tempo, % metanol, agitação e % NaCl isoladamente, suas interações e seus termos ao quadrado (se as respostas não forem lineares). No caso, foi considerado como significantes somente os termos com nível de significância de pelo menos 10%, sendo os demais desprezados. O pH da fase doadora apresentou influência significativa na extração dos analitos, porém não foi utilizado no PCC, em função da instabilidade que a OXI apresenta em pH acima de 8,0; em valores abaixo de 7,0 as quantidades de OXI e DEO na forma não ionizada (necessária para a extração por LPME) são menores e, conseqüentemente, a eficiência de extração também. A análise de variância mostrou que somente os termos lineares de tempo, agitação e % NaCl, o termo quadrático do tempo e o de interação tempo x metanol foram significantes (Tabela 8). Como a OXI e a DEO tiveram comportamentos similares nos ensaios realizados, apenas os dados da OXI foram empregados para a análise estatística.

Tabela 8 – Resumo da análise das variâncias observadas no PCC

FATOR	SQ ¹	GL ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
T	115443x10 ⁴	1	115443x10 ⁴	32,5278	0,0001*
M	581441x10 ²	1	581441x10 ²	1,6512	0,2230
A	144768 x10 ⁴	1	144768 x10 ⁴	41,1111	0,00003*
N	491194 x10 ³	1	491194 x10 ³	13,9490	0,0028**
T ²	164353 x10 ³	1	164353 x10 ³	4,6673	0,0517***
M ²	2118332	1	2118332	0,0602	0,8104
A ²	137678 x10 ²	1	137678 x10 ²	0,3910	0,5435
N ²	104067 x10 ³	1	104067 x10 ³	2,9553	0,1113
T x M	166014 x10 ³	1	166014 x10 ³	4,7144	0,0507***
T x A	110864 x10 ²	1	110864 x10 ²	0,3148	0,5851
T x N	444339 x10 ²	1	444339 x10 ²	1,2618	0,2833
M x A	110481 x10 ²	1	110481 x10 ²	0,3137	0,5857
M x N	756683	1	756683	0,0215	0,8859
A x N	84754	1	84754	0,0024	0,9617
Erro	422566 x10 ³	12	352138 x10 ²		
Total	408136 x10 ⁴	26			

T: tempo (minutos); M: metanol (%); A: agitação (rpm); N: NaCl (%).

* 0,1%; ** 1%, ***10%.

1 – Soma dos quadrados, 2 – Grau de liberdade, 3 – Quadrado médio, 4 – Número F, 5 -Probabilidade

A equação que poderia descrever o comportamento da variação da área de OXI em função dos fatores estudados é mostrada abaixo; o coeficiente de correlação foi de 0,9145.

$$\text{OXI} = 20.220,99 + 7.419,93\left(\frac{T - 30}{10}\right) + 3.766,03\left(\frac{T - 30}{10}\right)^2 + 8.341,66\left(\frac{A - 6}{2}\right) - 4.858,95\left(\frac{N - 10}{5}\right) - 3.221,16\left(\frac{T - 30}{10}\right)\left(\frac{M - 5}{2,02}\right)$$

Onde T é o tempo, A é agitação, N e M correspondem as porcentagens do sal e solvente orgânico na fase doadora, respectivamente.

A Figura 11 representa as áreas da OXI em função da agitação e quantidade de metanol. A agitação da amostra facilita a difusão dos analitos através da interface fase doadora - solvente orgânico, conseqüentemente, diminui o tempo necessário

para o sistema entrar em equilíbrio (SANTANA; OLIVEIRA; BONATO, 2005). A agitação máxima avaliada neste estudo foi de 4500 rpm, a qual proporcionou as maiores recuperações da OXI e DEO.

A supressão da ligação fármaco-proteína é outra forma de se aumentar a recuperação de analitos em LPME. A diluição da matriz, alterações de pH ou adição de solventes orgânicos na amostra são maneiras de se suprimir esta ligação (RASMUSSEN et al., 2000). Assim, o metanol adicionado na fase doadora visava reduzir a ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas. Entretanto, verificaram-se menores recuperações da OXI e DEO com o aumento da proporção de metanol na fase doadora, o que pode ter ocorrido devido a um aumento na solubilidade destes analitos na fase doadora na presença do metanol, diminuindo sua partição no solvente orgânico presente nos poros da membrana.

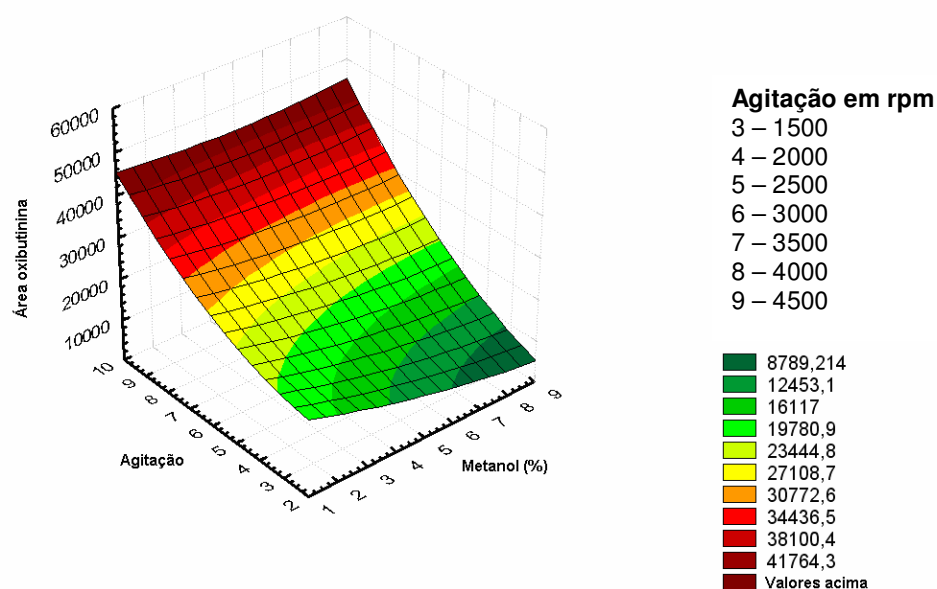


Figura 11 - Superfície de resposta da área de OXI em função da agitação e do teor de metanol

Na Figura 12 estão representadas as áreas da OXI em função do teor de NaCl e agitação. A superfície é plana, pois somente os termos lineares destes

fatores foram significantes. A adição de sal em amostras aquosas pode diminuir a solubilidade de compostos orgânicos, o que leva a um aumento na recuperação; este efeito é conhecido como “*salting out*” (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Por outro lado, altas concentrações salinas podem provocar precipitação do fármaco, formar uma camada iônica em volta da membrana causando a repulsão de analitos carregados com a mesma carga, além de aumentar a viscosidade do meio, reduzindo a velocidade de difusão dos analitos para a membrana (LEE et al., 1997). Neste estudo verificaram-se menores recuperações da OXI e DEO com a adição de sal.

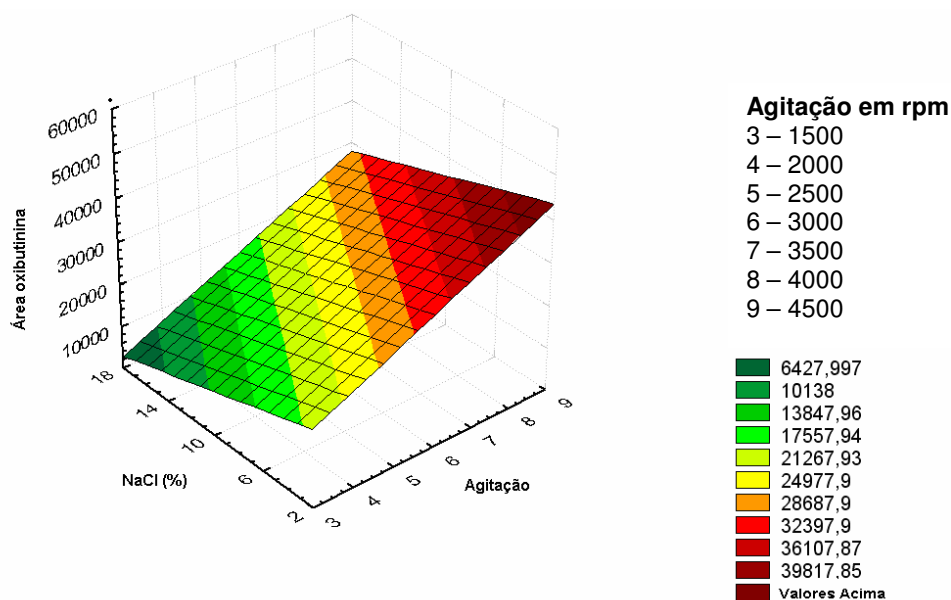


Figura 12.- Superfície de resposta da área de OXI em função da agitação e do teor de NaCl

A Figura 13 mostra as áreas da OXI em função da agitação e do tempo. A eficiência da extração depende da transferência de massa do analito da fase doadora para a orgânica e desta para a fase aceptora, conseqüentemente é

necessário um tempo adequado para que se estabeleça este equilíbrio. O efeito do tempo é quadrático, por isto a superfície é curva, verificando-se maiores recuperações da OXI e DEO com períodos mais longos de extração.

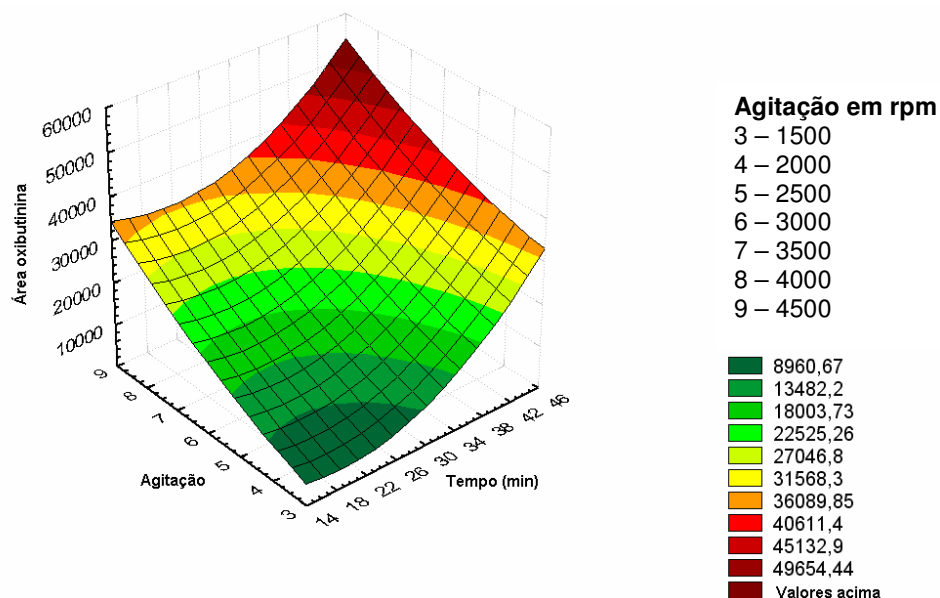


Figura 13 - Superfície de resposta da área de OXI em função da agitação e do tempo

Baseando-se nos resultados dos ensaios do PCC, foi realizada a análise canônica, porém a matriz dos coeficientes da equação de ajuste não tem solução, o que impede achar um ponto de ótimo na região estudada. Mas está claro que pode ser obtida melhor extração com aumento da agitação e do tempo e menor teor de NaCl. O metanol isoladamente não influencia na extração, porém quando avaliada sua interação com o tempo, o que se verifica é uma melhora na extração em tempos longos, ou seja, a presença de metanol retarda o processo extrativo, pois quanto maior sua proporção maior o tempo necessário para a extração.

Em função das limitações de agitação (operação máxima do agitador disponível no laboratório) e tempo (tempo de extração muito longo inviabiliza as análises), não se realizou nova análise experimental para se obter as condições ótimas de extração, ficando estabelecidas as seguintes condições de extração:

- *Tempo: 45 min*
- *Quantidade de metanol: nenhuma (padrões evaporados antes da extração)*
- *Quantidade de NaCl: nenhuma*
- *Agitação: 4500 rpm (máxima do agitador empregado)*
- *Comprimento da membrana: 6 cm*
- *Volume da fase doadora: 4 mL*
- *pH da fase doadora: pH 8,0*
- *Fase aceptora: ácido trifluoracético: 0,1 mol L⁻¹*

Após o procedimento de extração a fase aceptora foi coletada, seca, diluída em 70 µL de fase móvel e 50 µL foram injetados no cromatógrafo (Figura 14). Os cromatogramas das Figuras 14A e 14B mostram que o procedimento de extração empregado foi altamente eficiente na eliminação dos interferentes endógenos presentes no plasma ou fração microssomal de fígado de rato.

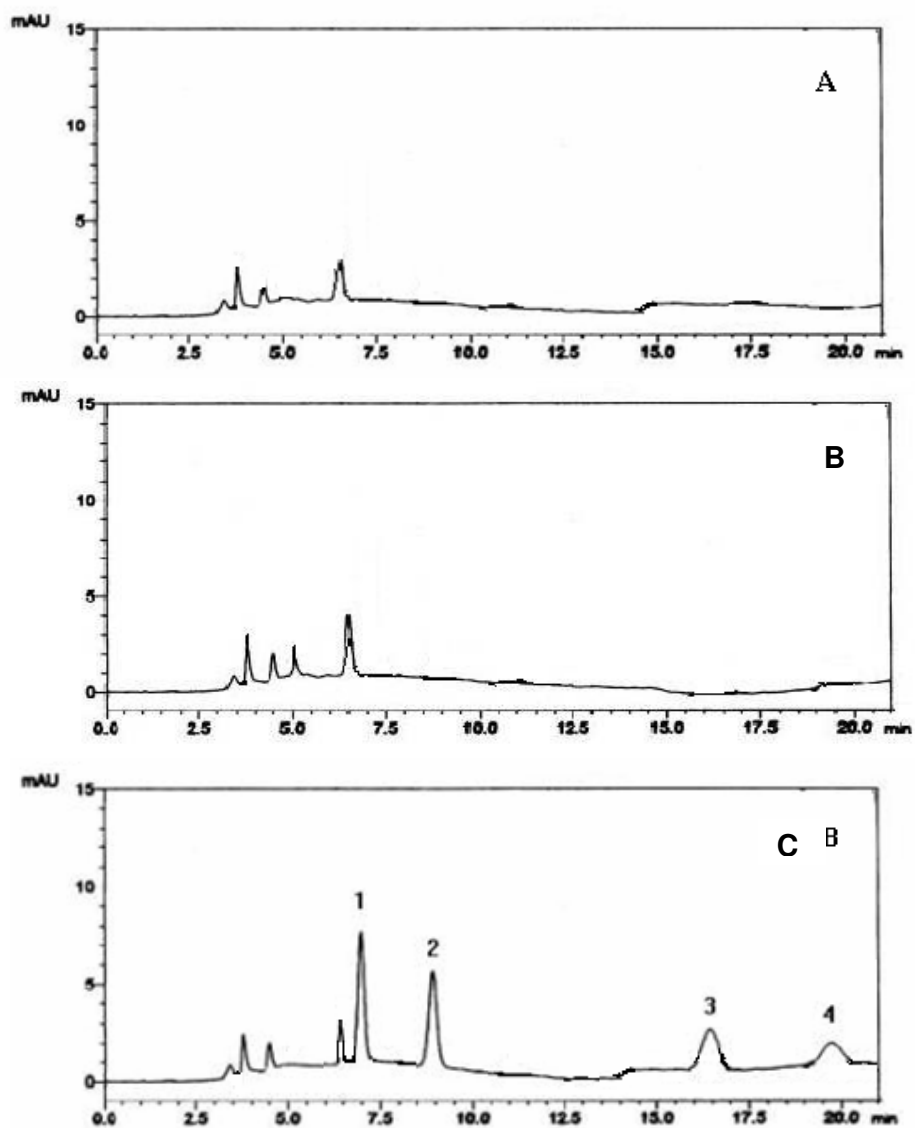


Figura 14 – Cromatogramas das amostras submetidas à extração, **A** corresponde ao branco de plasma, **B** ao branco da fração microsomal e **C** a amostra contendo OXI e DEO. Os picos 1 e 2 correspondem a (*R*)-OXI e (*S*)-OXI e os picos 3 e 4 a (*R*)-DEO e (*S*)-DEO. Fase móvel: hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão 0,9 mL min⁻¹, 262 nm

4.1.4 Validação

O objetivo principal da validação de um método analítico é estabelecer se ele é adequado ao propósito a que se destina (FDA, 2001). Agências nacionais como a ANVISA e internacionais como *Food and Drug Administration* (FDA) e *International Conference of Harmonization* (ICH) são alguns dos órgãos que estabelecem parâmetros os quais devem ser seguidos para validação de métodos bioanalíticos.

4.1.4.1 Linearidade

A linearidade é avaliada a partir da construção de curvas analíticas, as quais estabelecem a relação entre a concentração do analito e a resposta do instrumento.

Foram construídas curvas analíticas relacionando as concentrações dos enantiômeros da OXI e DEO no meio de incubação (x) *versus* as alturas dos picos (y). As Figuras 15 e 16 apresentam as curvas analíticas para os enantiômeros da OXI e DEO, respectivamente. Foram empregadas as alturas dos picos por proporcionarem resultados mais reprodutíveis.

Durante o desenvolvimento do método foram testados vários fármacos para serem empregados como padrão interno (PI), sendo escolhido o cloridrato de propranolol. Entretanto, durante a validação do método verificou-se que seu comportamento na extração não era reprodutível, por este motivo, optou-se pelo não emprego de PI.

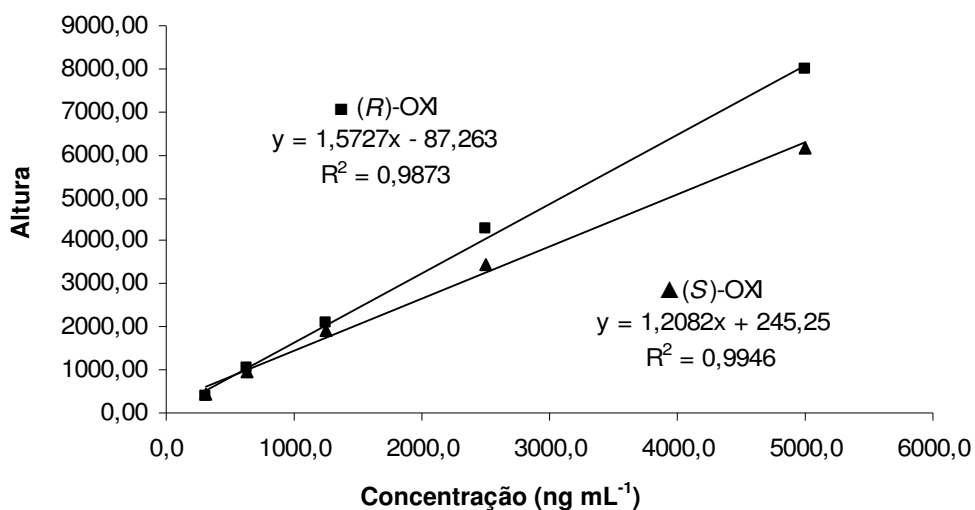


Figura 15 – Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da OXI (intervalo de concentração plasmática de 312 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero)

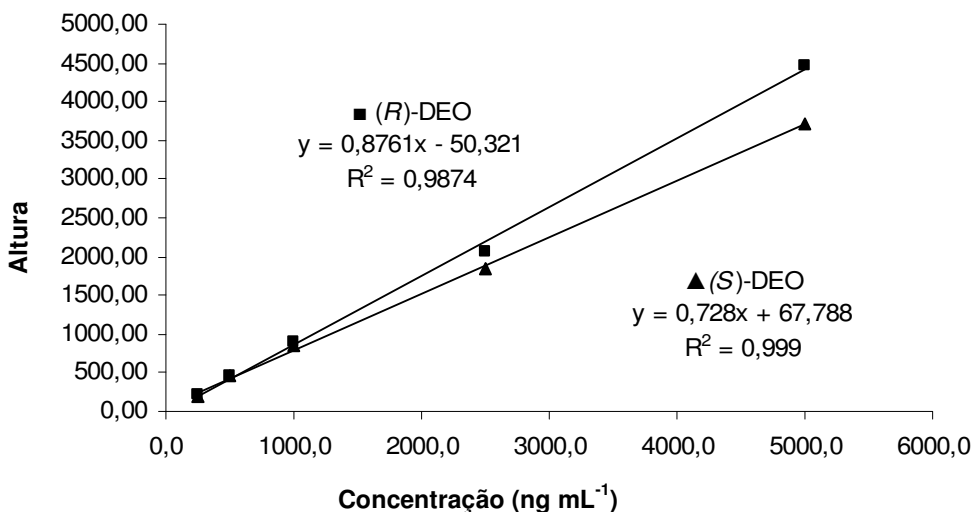


Figura 16 – Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da DEO (intervalo de concentração plasmática de 250 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero)

Os coeficientes de correlação obtidos para os enantiômeros da OXI e DEO foram superiores aos recomendados na literatura (ANVISA, 2003). Além disso, os desvios em relação aos valores nominais foram inferiores a 15%.

4.1.4.2 Recuperação

A porcentagem de recuperação é avaliada através da comparação das respostas das amostras extraídas, fortificadas com concentrações baixa, média e alta dos analitos com aquelas de padrões não submetidos ao procedimento de extração. Para métodos bioanalíticos, o coeficiente de variação não deve exceder 15% (ANVISA, 2003).

A Tabela 9 apresenta os dados referentes à recuperação dos enantiômeros da OXI e da DEO.

Tabela 9 – Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da OXI e DEO em função das diferentes concentrações no meio de incubação

Concentração (ng mL ⁻¹)	400	1250	3500		325	1000	3500
(R)-OXI	48,9	60,8	55,0	(R)-DEO	61,5	61,1	69,9
CV (%)	5,8	7,7	11,3	CV (%)	4,1	8,5	8,7
(S)-OXI	51,4	54,5	52,7	(S)-DEO	75,9	66,0	72,2
CV (%)	4,5	4,9	9,4	CV (%)	2,5	7,5	7,8

CV= coeficiente de variação, n= 3 para cada concentração

Nas técnicas miniaturizadas de extração observa-se usualmente recuperações inferiores às técnicas convencionais, entretanto no caso da LPME excelentes recuperações podem ser obtidas quando se emprega o modo de três fases (DE OLIVEIRA; CARDOSO; BONATO, 2007). Neste estudo também foram obtidas recuperações excelentes, principalmente se considerarmos a limitação do pH (pH ≤ 8,0) de trabalho devido ao problema de estabilidade da OXI.

4.1.4.3 Precisão e exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. A precisão é expressa matematicamente em estimativas de desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra e interensaios. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo, que para esse tipo de estudo deve ser de até 15%.

Os valores de precisão e exatidão intra e interensaios estão mostrados nas Tabelas 10 e 11, sendo que todos os valores de CV e erro foram inferiores a 15%.

Tabela 10 – Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da OXI

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
400 (ng mL⁻¹)						
(R)-OXI	454	9,3	13,4	452	12,5	12,9
(S)-OXI	448	10,0	12,0	458	7,8	14,6
1250 (ng mL⁻¹)						
(R)-OXI	1380	5,2	10,5	1414	9,7	13,1
(S)-OXI	1323	5,5	5,9	1382	6,6	10,6
3500 (ng mL⁻¹)						
(R)-OXI	3995	4,3	14,1	3684	11,2	5,3
(S)-OXI	4024	4,9	14,8	3982	10,2	13,8

CV= coeficiente de variação, E= erro relativo

Tabela 11 – Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da DEO

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
325 (ng mL⁻¹)						
(R)-DEO	293	14,8	-9,8	295	13,6	-9,1
(S)-DEO	300	14,7	-7,6	307	14,8	-5,5
1000 (ng mL⁻¹)						
(R)-DEO	944	10,3	-5,5	944	14,1	-5,6
(S)-DEO	970	9,8	-2,9	980	9,5	-1,9
3500 (ng mL⁻¹)						
(R)-DEO	4021	6,2	14,9	3760	14,2	7,4
(S)-DEO	3922	7,7	12,0	3950	6,8	12,9

CV= coeficiente de variação, E= erro relativo

4.1.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, com CV e erro relativo inferiores a 20% (SHAH et al., 1992). Este parâmetro foi de 250 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da DEO (Tabela 12).

Tabela 12 – Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação para os enantiômeros da DEO

Enantiômeros	Conc. Teórica ng mL ⁻¹	Conc. Obtida ng mL ⁻¹	Precisão CV (%)	Exatidão E (%)
(R)-DEO	250	281	13,4	12,5
(S)-DEO	250	282	9,0	13,1

4.1.4.5 Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da OXI e DEO foi avaliada através de estudos de ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela 13) e estabilidade no tempo de análise (Tabela 14). Nestas condições não se verificou a formação de produtos de degradação e para todos os enantiômeros os valores de p foram superiores a 0,05.

Tabela 13 - Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Ciclos de congelamento e descongelamento		
Concentração (ng mL⁻¹)	Valor do p	
	(R)-OXI	(S)-OXI
400	0,7431	0,8530
3500	0,0773	0,2636
Ciclos de congelamento e descongelamento		
Concentração (ng mL⁻¹)	Valor do p	
	(R)-DEO	(S)-DEO
325	0,5662	0,6478
3500	0,2576	0,1840

Tabela 14 - Estabilidade no tempo de análise

Tempo de análise		
Concentração (ng mL⁻¹)	Valor do p	
	(R)-OXI	(S)-OXI
400	0,2765	0,6218
3500	0,0697	0,2387
Tempo de análise		
Concentração (ng mL⁻¹)	Valor do p	
	(R)-DEO	(S)-DEO
325	0,0890	0,3195
3500	0,7605	0,5039

4.2 Aplicação do método

A biotransformação de um fármaco pode ser estudada através do emprego de modelos *in vitro* ou *in vivo*. Para estudo *in vitro* pode-se empregar sub-frações celulares hepáticas (microsomal, citosólica e fração S9), hepatócitos, fatias de fígado e enzimas recombinantes do CYP450 (TINGLE; HELSBY, 2006). Os métodos *in vitro* são úteis para a seleção racional de espécies de animais, para estudos toxicológicos, para a comparação de perfil metabólico, para avaliar a influência de diferentes espécies na biotransformação e produção de metabólitos para desenvolvimento de métodos bioanalíticos, etc. Estes estudos são mais fáceis, rápidos e baratos, além de permitirem o emprego de elevada quantidade de fármaco (EKINS et al., 2000).

Os estudos *in vivo* são mais abrangentes, pois levam em consideração todas as etapas farmacocinéticas, porém as variações interespecies e interindividuais dificultam a transposição dos resultados para humanos (SILVA et al., 2002).

Não existe modelo ideal para estudar a biotransformação de fármacos; atualmente, o que mais se emprega é a combinação de modelos *in vitro* e *in vivo*, embora cada vez mais as agências regulamentares estimulem o emprego de modelos *in vitro* (TINGLE; HELSBY, 2006). Sendo assim, o método desenvolvido foi aplicado em um estudo de biotransformação *in vitro* utilizando a fração microsomal de fígados de ratos Wistar (Figura 17). As amostras de fração microsomal foram diariamente retiradas do freezer e submetidas ao processo de incubação e posterior extração e análise. Para a quantificação dos enantiômeros da DEO eram construídas, diariamente, curvas analíticas de amostras de plasma diluído, contendo

soluções-padrão da DEO nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de linearidade (item 3.1.3.1).

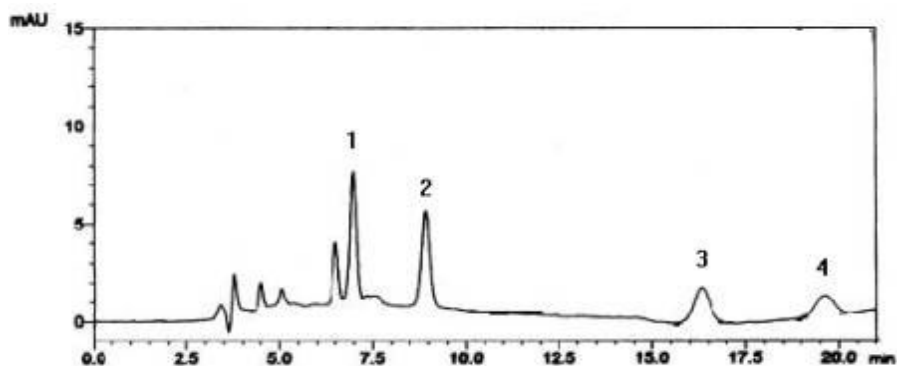


Figura 17 – Cromatograma da amostra extraída após incubação. Os picos 1 e 2 correspondem a (*R*)-OXI e (*S*)-OXI e os picos 3 e 4 a (*R*)-DEO e (*S*)-DEO. Fase móvel hexano: isopropanol: etanol (95:4:1, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão 0,9 mL min⁻¹, 262 nm. Condições de incubação: concentração de proteínas no meio de incubação: 0,4 mg mL⁻¹, concentração de cada enantiômero da OXI: 5 µg mL⁻¹, tempo de incubação: 3 minutos

4.2.1 Otimização das condições de incubação

4.2.1.1 Tempo de incubação

Foram realizadas incubações (em triplicata) nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Nestes ensaios, a concentração da solução da OXI utilizada foi de 1,0 mg mL⁻¹ (correspondente a 5 µg de cada enantiômero da OXI por mL de meio de incubação) e a concentração de proteínas no meio de incubação foi de 1,0 mg mL⁻¹. A Figura 18 ilustra a relação entre a concentração dos enantiômeros da DEO nos diferentes tempos de incubação.

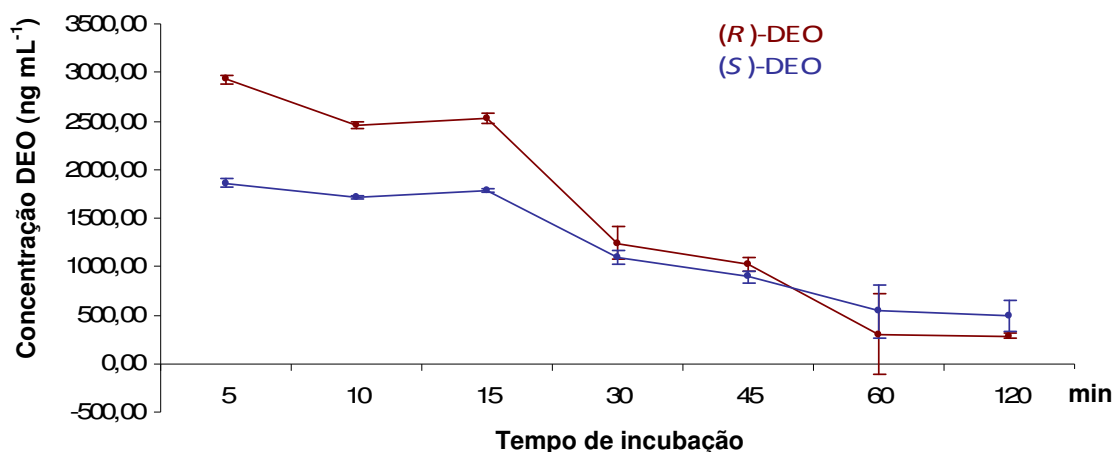


Figura 18 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função do tempo de incubação

Verifica-se que a biotransformação da OXI é bastante rápida. Nos primeiros 5 minutos já existe a formação de grande quantidade dos enantiômeros da DEO, porém nas incubações em períodos maiores a concentração deste metabólito diminui. A fração microssomal do fígado apresenta grande quantidade de enzimas e estas estão constantemente transformando substratos; o que ocorre em tempos longos de incubação é a biotransformação da DEO em outros metabólitos (Figura 19). Analisando os cromatogramas obtidos não se observa a presença de picos adicionais. Portanto, conclui-se que esses produtos formados devem ser bastante polares inviabilizando suas extrações e/ou eluições no sistema cromatográfico.

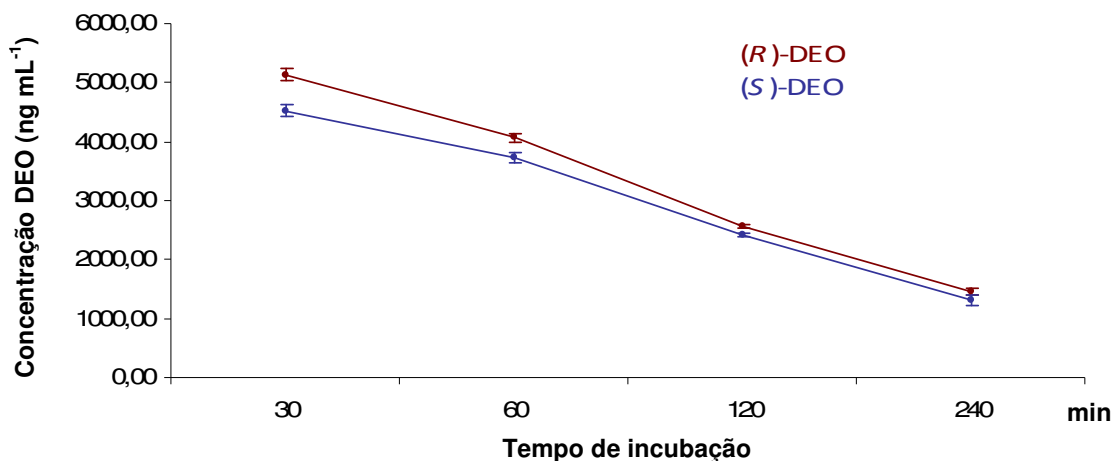


Figura 19 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da incubação da DEO com fração microsomal de fígado de rato. Condições de incubação: concentração de proteína no meio de incubação de 1,0 mg mL⁻¹, concentração da DEO no meio de incubação: 10 µg mL⁻¹ de cada enantiômero

4.2.1.2 Concentração de proteínas da fração microsomal no meio de incubação.

Foram realizadas incubações (em triplicata) com as concentrações de proteínas no meio de incubação de 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹. Partiu-se de uma fração microsomal (estoque) com concentração de proteínas de 14,76 mg mL⁻¹. Nestes ensaios a concentração da solução da OXI utilizada foi de 1,0 mg mL⁻¹ (correspondente a 5 µg de cada enantiômero da OXI por mL de meio de incubação) e o tempo de incubação foi de 10 min. A Figura 20 ilustra a relação entre a concentração dos enantiômeros da DEO nas diferentes concentrações de proteínas no meio de incubação.

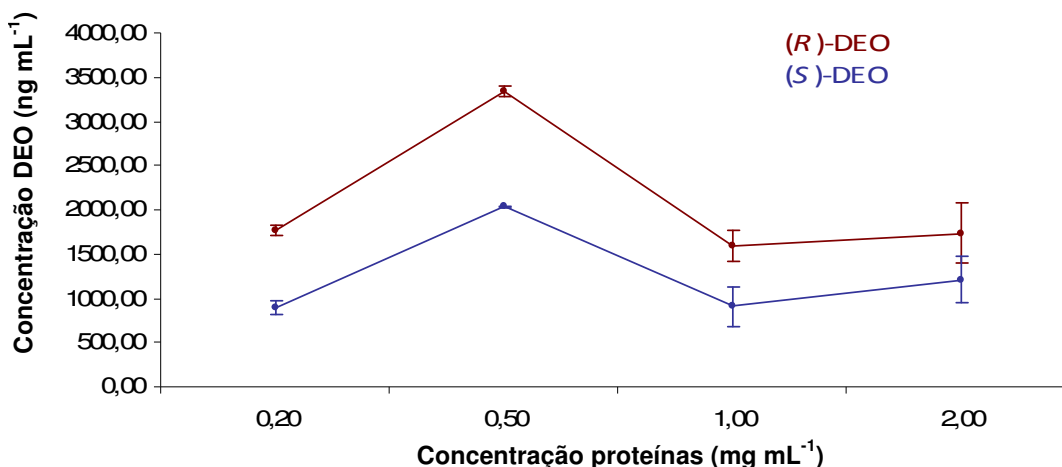


Figura 20 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração de proteínas no meio de incubação

A concentração de proteínas no meio de incubação que possibilitou maior taxa de biotransformação da OXI foi de 0,5 mg mL⁻¹. Sendo que para se obter esta concentração é necessário o emprego de 32 µL da fração microsomal (estoque). Nas concentrações de 1 e 2 mg mL⁻¹ verificou-se coeficientes de variação elevados.

Com o aumento da concentração de enzima (maior concentração da fração microsomal) o que se verificou é a diminuição da concentração da DEO devido à biotransformação deste metabólito em outros compostos (Figura 19).

4.2.1.3 Concentração da OXI

Foram realizadas incubações (em triplicata) com 10 µL das soluções de OXI racêmica nas concentrações de 200, 400, 1000 µg mL⁻¹ e 20 µL de 1000 µg mL⁻¹, equivalentes a concentrações de 1000, 2000, 5000 e 10000 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação. Nestes ensaios a concentração de proteínas da fração microsomal foi de 0,5 mg mL⁻¹ e o tempo de incubação de 10 min. A Figura

21 ilustra a relação entre a concentração dos enantiômeros da DEO nas diferentes concentrações da OXI no meio de incubação.

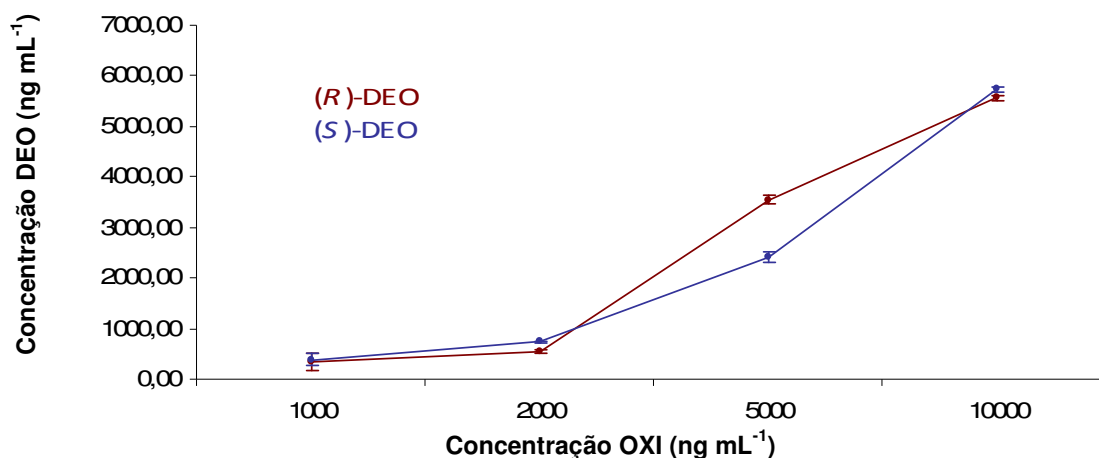


Figura 21 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração da OXI no meio de incubação

Verificou-se que no intervalo avaliado, não houve saturação das enzimas, que é caracterizada pela produção constante do produto de biotransformação. O que se observa é que em concentrações altas e baixas da OXI existe uma diminuição da estereosseletividade no processo de biotransformação.

4.2.2 Estudos de biotransformação

Baseando-se nos resultados preliminares obtidos, foram delineados novos experimentos para se avaliar as condições lineares de biotransformação da OXI e estabelecer as constantes cinéticas de Michaelis-Menten.

4.2.2.1 Tempo de incubação

Os testes anteriores haviam mostrado um decaimento na produção da (*R*)-DEO e (*S*)-DEO em função do tempo de incubação (Figuras 18 e 19), por este motivo optou-se por analisar o comportamento em tempos menores, sendo avaliados os seguintes tempos: 2, 3, 4, 5, 7 e 10 minutos. Nestes ensaios, a concentração da solução de OXI utilizada foi de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (correspondente a $5 \mu\text{g}$ de cada enantiômero da OXI por mL de meio de incubação) e a concentração de proteínas no meio de incubação foi de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. A Figura 22 mostra os resultados obtidos.

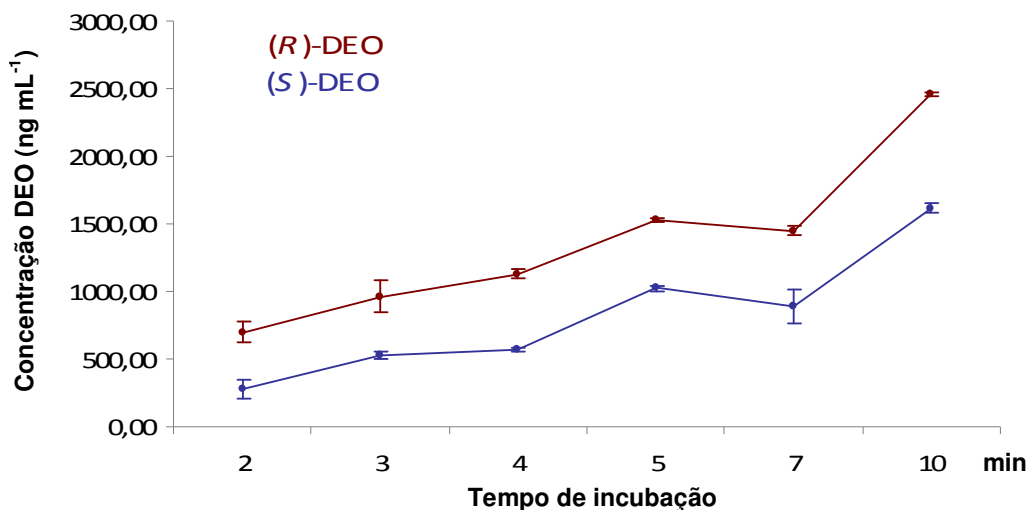


Figura 22 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função do tempo de incubação

Observa-se uma faixa de linearidade entre 2 e 5 minutos, por este motivo, 3 minutos foi estabelecido como tempo de incubação para os novos experimentos.

4.2.2.2 Concentração de proteínas da fração microssomal no meio de incubação.

Os resultados preliminares para esta variante (Figura 20) demonstraram uma região de linearidade nos intervalos de 0,2 – 0,5 mg mL⁻¹. Para se ter uma informação mais precisa a respeito de qual a concentração enzimática mais adequada, ampliou-se os experimentos nesta região de concentração, estabelecendo-se as seguintes concentrações: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg mL⁻¹. As incubações foram realizadas em triplicada, partindo-se da fração microssomal (estoque) com concentração de proteínas de 14,76 mg mL⁻¹. Nestes ensaios a concentração da solução da OXI utilizada foi de 1,0 mg mL⁻¹ (correspondente a 5 µg de cada enantiômero da OXI por mL de meio de incubação) e o tempo de incubação foi de 3 min. Os resultados são mostrados na Figura 23.

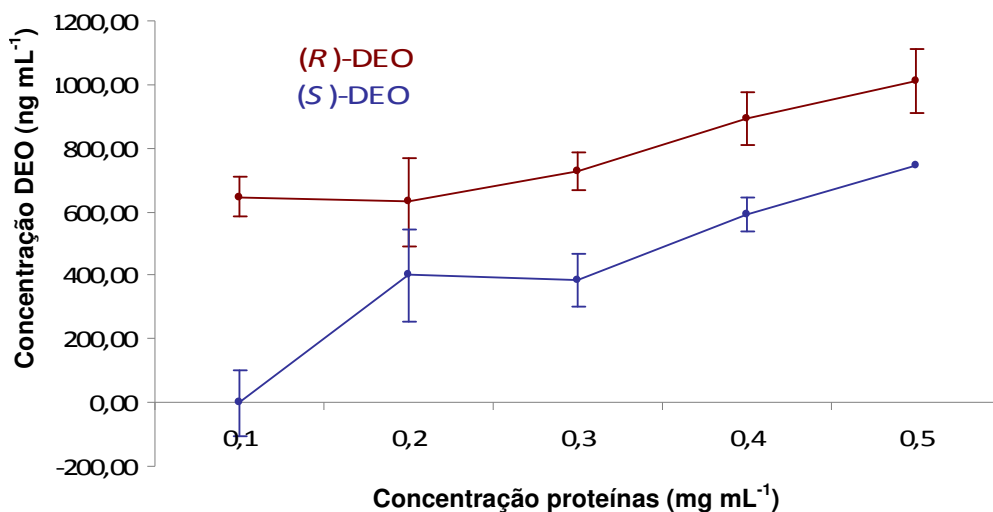


Figura 23 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função da concentração de proteínas no meio de incubação

Observa-se uma faixa de linearidade entre 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹, por este motivo, 0,4 mg mL⁻¹ passou a ser empregada como concentração de proteína no

meio de incubação para os novos experimentos. Para se obter esta concentração é necessário o emprego de 27 μL da fração microsomal (estoque).

4.2.2.3 Determinação das constantes cinéticas

Estabelecidas as condições nas quais as enzimas respondem de maneira linear, partiu-se para a determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} . Diferentes concentrações do substrato (2,8, 5,5, 14, 28 e 42 nmol L^{-1}) foram incubadas por 3 minutos empregando 0,4 mg mL^{-1} de proteína no meio de incubação. A Figura 24 ilustra a relação entre a concentração dos enantiômeros da DEO nas diferentes concentrações da OXI no meio de incubação.

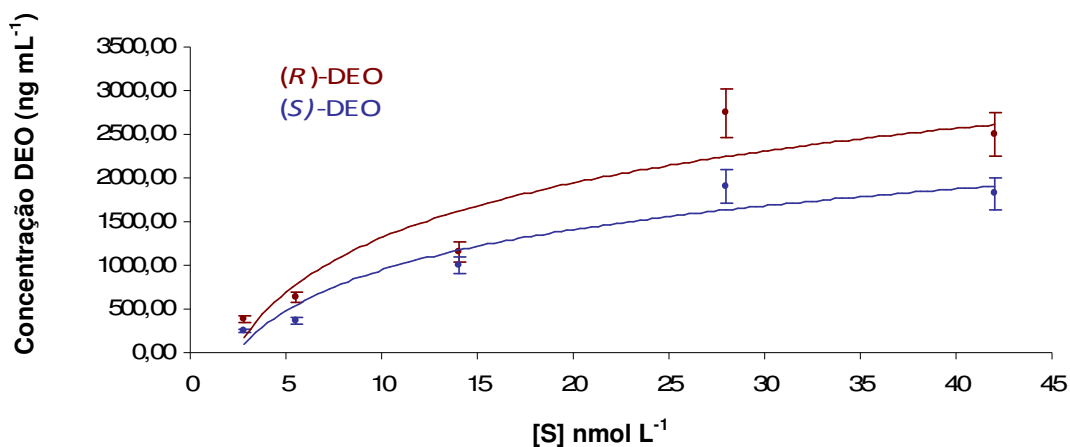


Figura 24 – Variação da concentração dos enantiômeros da DEO em função das diferentes concentrações de OXI no meio de incubação

A velocidade de biotransformação da OXI depende da concentração do substrato e as constantes de Michaelis-Menten foram calculadas empregando a regressão linear (Figuras 25 e 26), sendo $V_{max} = 3,6 \text{ nmol L}^{-1} \text{ (R)-DEO/ mg mL}^{-1}$

proteína/ min e $V_{\max} = 1,9 \text{ nmol L}^{-1} \text{ (S)-DEO/ mg mL}^{-1} \text{ proteína/ min}$. Os valores de K_m foram $9,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $7,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para a (R)-OXY e a (S)-OXY, respectivamente.

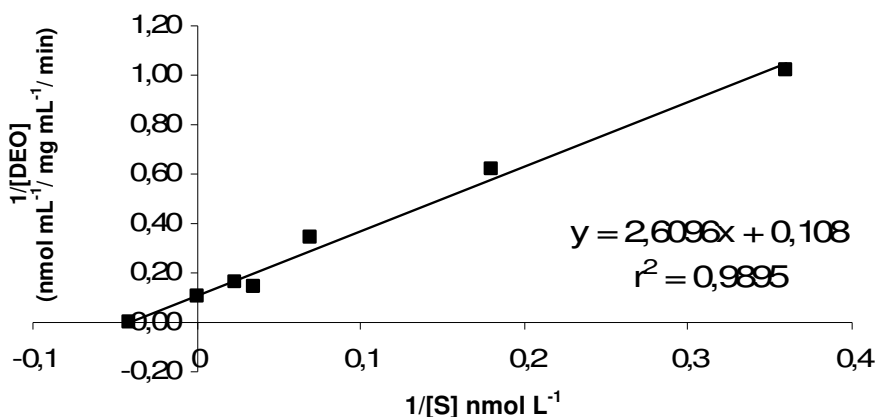


Figura 25 – Curva de Lineweaver-Burk para a (R)-OXI, onde $V_{\max} = 3,6 \text{ nmol L}^{-1} \text{ (R)-DEO/ mg mL}^{-1} \text{ proteína/ min}$ e $K_m = 9,3 \text{ nmol L}^{-1}$

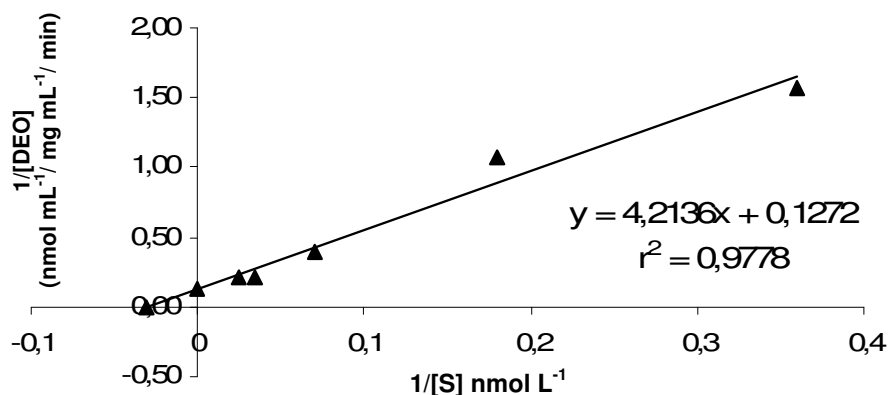


Figura 26 – Curva de Lineweaver-Burk para a (S)-OXI, onde $V_{\max} = 1,9 \text{ nmol L}^{-1} \text{ (S)-DEO/ mg mL}^{-1} \text{ proteína/ min}$ e $K_m = 7,9 \text{ nmol L}^{-1}$

No processo de biotransformação os fármacos sofrem alterações químicas, produzindo compostos mais polares, facilitando, portanto, a eliminação destas substâncias pelo organismo (MEYER, 1996). Um dos fatores que afeta a velocidade

de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração do substrato. Em qualquer instante de uma reação, a enzima existe em duas formas, a não ligada ao substrato, ou a forma livre E, e a forma ligada ES. A velocidade máxima (V_{max}) da reação é atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo ES, e a concentração da enzima livre E é insignificante. Neste caso, diz-se que a enzima está “saturada” com o substrato e a velocidade da reação não aumenta mais com o aumento de [S]. Todas as enzimas que exibem uma tendência hiperbólica de V em relação à [S] são ditas seguir a cinética de Michaelis-Menten, sendo que cada enzima apresenta valores ótimos de K_m que refletem o ambiente celular, a concentração do substrato e a química da reação que está sendo catalisada.

As reações enzimáticas de biotransformação de fármacos geralmente seguem a cinética de Michaelis-Menten, possibilitando, conseqüentemente o cálculo das constantes cinéticas envolvidas nestas reações.

Avaliar as condições de incubação (tempo, temperatura, pH etc) é importante, pois as enzimas exigem condições ideais para atuarem de maneira ótima. Neste estudo as incubações foram realizadas a 37°C em pH 7,4, ou seja, em condições fisiológicas; o tempo de incubação que proporcionou respostas lineares foi de 3 minutos.

O K_m demonstra a afinidade da enzima ao substrato; quanto maior o valor de K_m menor a afinidade da enzima ao substrato. Neste estudo verificou-se uma pequena diferença de afinidade das enzimas aos enantiômeros da OXI ($K_m = 9,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $7,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para a (*R*)-OXY e a (*S*)-OXY, respectivamente), sendo maior a afinidade à (*S*)-OXY. Também foi demonstrado, a partir dos valores de V_{max} , que a (*R*)-DEO é formada mais extensivamente do que a (*S*)-DEO.

Recentemente, Mizushima et al. (2007) estudaram a biotransformação da OXI, empregando fração microsomal humana. Com relação ao K_m , observaram valores de 1,73 para a razão (*R*)-OXI/ (*S*)-OXI; a razão obtida para os valores de V_{max} foi de 1,41. Neste estudo, verificamos resultados semelhantes, com razões de 1,17 para K_m e de 1,89 para V_{max} .

Outro estudo conduzido com a administração da OXI racêmica a voluntários sadios evidenciou que a eliminação da (*R*)-OXI e (*R*)-DEO é mais lenta do que a dos enantiômeros (*S*) (MIZUSHIMA et al., 2007). Existem variações estereosseletivas também na ligação dos enantiômeros às proteínas plasmáticas, sendo que a (*S*)-OXI e (*R*)-DEO se ligam mais fortemente a estas proteínas (SHIBUKAWA et al., 2002).

Zobrist et al. (2001) também avaliaram a cinética da OXI em humanos após a administração de preparações de uso oral e transdérmico, observando maior biodisponibilidade da (*S*)-DEO para preparações de uso transdérmico e da (*R*)-DEO para a preparação de uso oral.

O que fica evidente nos estudos de cinética da OXI, é que a enantiosseletividade neste processo é atribuída a mais de um parâmetro, merecendo destaque a ligação enantiosseletiva da OXI às proteínas plasmáticas e a biotransformação enantiosseletiva, com maior afinidade enzimática à (*S*)-OXI.

5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento de um método para análise enantiosseletiva da OXI e de seu principal metabólito, bem como a aplicação deste método em um estudo de biotransformação *in vitro* empregando a fração microssomal de fígados de ratos. A técnica de preparação das amostras utilizada foi a LPME, sendo que as condições de extração foram otimizadas através de planejamento fatorial.

As condições cromatográficas que proporcionaram a separação dos enantiômeros da OXI e DEO foram: coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm), hexano: isopropanol: etanol 95:4:1 (v/v/v) com 0,3% de DEA como fase móvel, vazão 0,9 mL min^{-1} , e detecção em 262 nm. Nestas condições, obteve-se a completa resolução dos enantiômeros da OXI e DEO em 21 min.

O emprego do planejamento fatorial para a otimização do procedimento de extração se mostrou muito adequado, pois com poucos ensaios, avaliou-se a influência de vários fatores no processo extrativo. Ficou estabelecido que o tempo de extração e a agitação da amostra aumentam a recuperação da OXI e DEO e que a adição de NaCl e metanol na fase doadora diminuem a eficiência do processo. Após a otimização, a seguinte condição de extração foi selecionada: tempo de 45 min, nenhuma adição de metanol ou NaCl, agitação da amostra a 4500 rpm, membrana de 6 cm de comprimento, fase doadora em pH 8,0 e ácido trifluoracético 0,1 mol L^{-1} como fase acceptora. A LPME mostrou ser uma técnica com alta seletividade, baixo custo e consumo de solventes e, neste caso, proporcionou excelentes recuperações.

Todos os métodos descritos na literatura para análise enantiosseletiva da OXI e DEO em fluídos biológicos empregam cromatografia líquida acoplada a

espectrometria de massas (HPLC-MS-MS) e a LLE e SPE como técnicas de preparação das amostras (ZOBRIST et al., 2001; MIZUSHIMA et al., 2007; ALEBICKOLBACH; ZAVITSANOS, 1997). Até o momento, a LPME não é descrita na literatura como técnica de preparação de amostra para extração da OXI e DEO de amostras de origem biológica. Como a LC-MS-MS é uma técnica muito sensível, estes trabalhos obtiveram baixos limites de quantificação para os enantiômeros da OXI e DEO, inferiores aos aqui relatados. Entretanto, os valores obtidos neste estudo foram suficientes para permitir a sua aplicação no estudo de biotransformação proposto.

No estudo de biotransformação da OXI determinaram-se as constantes cinéticas e evidenciou-se uma pequena diferença de afinidade da enzima aos enantiômeros da OXI ($K_m = 9,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $7,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para a (*R*)-OXY e para a (*S*)-OXY, respectivamente), sendo maior a afinidade enzimática à (*S*)-OXY, devido ao menor valor de K_m para este enantiômero.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEBIC-KOLBACH, T.; ZAVITSANOS, A. P. Chiral bioanalysis by normal phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 759, p. 65-77, 1997.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 963, p. 303-312, 2002.

ANVISA, Resolução RE 899, 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

APPELL, R. A.; CHANCELLOR, M. B.; ZOBRIST, R. H.; THOMAS, H.; SANDERS, S. W. Pharmacokinetics, metabolism, and saliva output during transdermal and extended-release oral oxybutynin administration in healthy subjects. **Mayo Clin Proc.**, Rochester, v. 78, p. 696-702, 2003.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Anal. Chem.**, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BONATO, P. S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; ILHA, M. H.; LIMA, R. P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide and protein based chiral stationary phases. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 13, p. 190-199, 2002.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 719, p. 3-13, 1996.

CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an *in vitro* metabolic study. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 37, 703-708, 2005.

DAVILA, G. W. Transdermal oxybutynin: a new treatment for overactive bladder. **Exp. Opin. Pharmacother.**, London, v. 4, p. 2315-2324, 2003.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of hydroxychloroquine and its metabolites in human urine by liquid-phase microextraction and CE. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p. 1081-1091, 2007.

DIETZ, C.; SANZ, J.; CÁMARA, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1103, p. 183–192, 2006.

EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; McROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, London, v. 44, p. 313-324, 2000.

FDA, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 25 p. U.S.A. May 2001.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1158, p. 2-14, 2007.

FREDERICKS, C.M.; ANDERSON, G.F.; KREULEN, D.L. A study of anticholinergic and antisoasmodic activity of oxybutynin (Ditropan) on rabbit detrusor. **Invest Urol.**, Baltimore, v. 12, p. 317, 1975.

GONZALEZ, F. The molecular biology of cytochrome P450s. **Pharmacol. Rev.**, Bethesda, v. 40, p. 243-288, 1988.

GUAY, D. R. P. Clinical pharmacokinetics of drugs used to treat urge incontinence. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 42, p. 1243-1285, 2003.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 27, p. 357–372, 2002.

HALPERT, J. R.; GUENGERICH, F. P.; BEND, J. R.; CORREIA, M. A. Selective inhibitors of cytochromes P450. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 125, p. 163-175, 1994.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. Solvent microextraction into a single drop. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JUCHAU, M. R. Substrate Specificities and functions of the P450 cytochromes. **Life Sci.**, Oxford, v. 47, p. 2385-2394, 1994.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

KIM, H.; HAN, S. B. Sensitive determination of oxybutynin and desethyloxybutinin in dog plasma by LC-ESI/MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 31, p. 341-349, 2003.

LAKE, B. G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: **Biochemical Toxicology – a practical approach**. Oxford, IRL PRESS, cap. 8, p. 183-215, 1987.

LEE, M. R.; YEH, Y. C.; HSIANG, W. S.; CHEN, C. C. Application of solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry for determination of chlorophenols in urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 707, p. 91-97, 1997.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 885, p. 153-193, 2000.

LUKKARI, E.; TAAVITSAINEN, P.; JUHAKOSKI, A.; PELKONEN, O. Cytochrome P450 specificity of metabolism and interaction in human liver microsomes. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 84, p. 161-166, 1998.

MASSOUD, R.; FEDERICI, G.; CASCIANI, S.; Di STASI, S. M.; FUCCI, G.; GIANNANTONI, A.; CORTESE, C. Extraction and determination of oxybutynin in human bladder samples by reversed-phase high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 734, p. 163-167, 1999.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism. **J. Pharmacokinet. Biopharm.**, New York, v. 24, p. 449-459, 1996.

MIYAMOTO, E.; DEMIZU, Y.; MURATA, Y.; YAMADA, Y.; KAWASHIMA, S. High performance liquid chromatographic preparation of oxybutynin enantiomers on a chiral stationary phase. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 653, p. 135-137, 1993.

MIZUMA, E. K.; TAKESHITA, M. S.; SUAID, H. J.; MARTINS, A. C. P.; TUCCI, S.; COLOGNA A. J.; GONÇALVES, M. A. Efeito do cloridrato de oxibutinina na hiperatividade vesical consequente a cistite hemorrágica. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 18, p. 24-27, 2003.

MIZUSHIMA, H.; TAKANAKA, K.; ABE, K.; FUKAZAWA, I.; ISHIZUKA, H. Stereoselective pharmacokinetics of oxybutynin and N-desethyloxybutynin in vitro and in vivo. **Xenobiotica**, Oxon, v. 37, p. 59-73, 2007.

MORGAN, E. T. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. **Drug Metab. Rev.**, New York, v. 29, p. 1129-1188, 1997.

MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 20, n. 10, p. 1-10, 2006.

NEBERT, D. W.; RUSSEL D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet.**, London, v. 62, p. 360-380, 2002.

NETO, A. J. S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

OINONEN, T.; LINDROS, K. O. Zonation of hepatic cytochrome P450 expression and regulation. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 329, p. 17-35, 1998.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharides derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angew. Chem. Int. Edit.**, Weinheim, v. 37, p. 1020-1043, 1998.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 817, p. 3–12, 2005.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-Liquid-Liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 10, p. 565–574, 2003.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. I. A.; LABA, R. F. **Introduction a la HPLC – aplicación y práctica**, Buenos Aires, Artes Gráficas Farro S.A., cap. 12, p. 301-328, 1992.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2004.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G.; GRONHAUG, T. Development of a single in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 873, p. 3–11, 2000.

RENTSCH, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **J. Biochem. Biophys. Meth.**, Amsterdam, v. 54, p. 1–9, 2002.

SANTANA, F. J. M.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 549, p. 96-103, 2005.

SAÚDE PÚBLICA. Utilização de modelos in vitro para o estudo da biotransformação de xenobióticos, 2001. Disponível em http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9798/g003_2.htm acesso em 25 de março de 2006.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Sci.**, Easton, v. 8(3), p. 309-312, 1992.

SHIBUKAWA, A.; YOSHIKAWA, Y.; KIMURA, T.; KURODA, Y.; NAKAGAWA, T.; WAINER, I. W. Binding study of desethoxybutynin using high-performance frontal analysis method. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 768, p. 189-197, 2002.

SILVA, M. G.; OGANÃS, L. G.; TORRES, N. W.; LÓPEZ, A. P. Detección de los metabolitos de la toxina T-514 (Peroxisomicina A1) del género *Karwinskia* in vivo e in vitro. **Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba**, Cordoba, v. 5, p. 485-492, 2002.

SMITH, E. R.; WRIGHT, S. E.; ABERG, G.; FANG, Y.; MCCULLOUGH, J. R. Comparison of the antimuscarinic and antispasmodic actions of racemic oxybutynin and desethoxybutynin and their enantiomers with those of racemic terodiline. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 48, p. 1012-1018, 1998.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G. J. Solid-phase microextraction for analysis of biological samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 745, p. 49-82, 2000.

TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can in vitro metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 21, p. 184-190, 2006.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discov. Today**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 138–147, 1997.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 532–530, 2000.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

ZOBRIST, R. H.; QUAN, D.; THOMAS, H. M.; STANWORTH, S.; SANDERS, S. W. Pharmacokinetics and metabolism of transdermal oxybutynin: in vitro and in vivo performance of a novel delivery system. **Pharm. Res.**, New York, v. 20, n. 1, p. 103–109, 2003.

ZOBRIST, R. H.; SCHMID, B.; FEICK, A.; QUAN, D.; SANDERS, S. W. Pharmacokinetics of the R- and S-Enantiomers of oxybutynin and N-desethyloxybutynin following oral and transdermal administration of the racemate in healthy volunteers. **Pharm. Res.**, New York, v. 18, n. 7, p. 1029–1034, 2001.
