UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS

Marcella Galatti Pavan

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto
2021

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós Graduação em Toxicologia

Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre

Orientada: Marcella Galatti Pavan
Orientadora: Profª Drª Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia em 19/08/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto
2021

PAVAN, M. G.

Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS

Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca

MESTRADO

FCFRPUSP

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pavan, Marcella Galatti

Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS. Ribeirão Preto, 2021.

79p. : il.; 30 cm.

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

Orientadora: de Gaitani, Cristiane Masetto

1. LC-MS/MS. 2. Carvedilol. 3. Análise enantiosseletiva. 4. SALLE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Marcella Galatti Pavan
Título do trabalho: Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que todos os dias me dá força e coragem para alcançar meus objetivos.

Aos meus amados pais **Adriana Pavan** e **José Pavan**, por serem minha base e apoio, por sempre terem feito de tudo para mim e me ensinado que a educação é o bem mais valioso que eu posso ter. Sem vocês eu nada seria e nenhuma dedicatória é capaz de reconhecer devidamente o quanto sou grata a vocês.

Ao meu marido **Felipe Andrade**, por todo amor, incentivo, companheirismo e compreensão. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma não acreditava ser capaz, por tomar as minhas batalhas como nossas, por estar ao meu lado desde à graduação apoiando meus estudos e não me deixando desistir nos momentos de estresse.

A todos os meus **familiares**, que sempre torceram pelas minhas conquistas.

À minha grande amiga **Ana Júlia**, por ter sido essencial durante todo o mestrado, me ajudando, ouvindo e aconselhando, serei sempre grata pela sua amizade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani**, pelas oportunidades de aprendizado, por compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio e paciência. Obrigada por acreditar em mim.

Aos meus amigos de laboratório, **Cristina Montanari** e **Guilherme Tinoco** pelos ensinamentos, pela boa companhia, conversas e risadas.

À técnica **Mariana Barbieri**, por toda ajuda prestada no laboratório.

Às minhas amigas de graduação, **Thássia e Natália**, por sempre estarem presentes e me apoiando desde o começo.

À **Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes** e à **Priscila Yamamoto** pela dedicação e apoio, sem vocês o trabalho não seria possível.

Ao **Dr. Rodrigo Moreira da Silva** por toda a ajuda realizada para a conclusão deste trabalho. Obrigada pela paciência e por ter sido a luz quando as coisas pareciam não ter solução.

Aos professores **Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** e **Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta** pelas sugestões e contribuições feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

Aos funcionários da secretaria de **pós graduação em toxicologia**, em especial a Rose por toda a assistência prestada.

Ao **Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco** por ceder as bolsas de plasma branco para esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Pavan, M. G. **Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS.** 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O carvedilol é um betabloqueador não seletivo de terceira geração utilizado no tratamento de doenças como hipertensão, angina pectoris, arritmia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva. É comercializado como uma mistura racêmica dos enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+). O carvedilol é amplamente utilizado em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, no período anterior e posterior a cirurgia. Entretanto, uma das consequências dessa cirurgia é o comprometimento da absorção de nutrientes e fármacos. Sendo assim a determinação da concentração plasmática do carvedilol nestes pacientes é de grande importância para realizar o ajuste de dose. A maioria dos métodos descritos na literatura para a quantificação do carvedilol em amostras de plasma utiliza técnicas de preparo de amostras como a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido, a extração em suporte sólido, a microextração líquido-líquido dispersiva e a extração em fase sólida. Até o momento não foi relatado nenhum método usando a extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE). Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método para análise dos enantiômeros do carvedilol em plasma humano usando a SALLE e análise por LC-MS/MS e aplicar esse método em amostras de plasma de pacientes do HCFMRP/USP submetidos à cirurgia bariátrica. A seleção do solvente orgânico e solução salina, a serem utilizadas na extração, foi feita baseada em testes qualitativos. A identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da SALLE foi feita empregando um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 4 fatores. Posteriormente foi empregado um delineamento composto central (CCD) para otimizar a condição ótima de extração. A separação cromatográfica dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos foi realizada em uma coluna Chirobiotic V/Astec (0,46x25cmx 5 µm) acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100 RP-18 (5uM, 4x4 mm). A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol:etanol (90:10 , v/v) e 0,02% de dietilamina e 0,18% ácido acético , em uma temperatura de 21°C e vazão 0,6 mL/min. Foi utilizado o modo positivo de ionização por eletrospray (ESI+) e as transições avaliadas foram m/z 407 → 100 para o carvedilol e m/z 235 → 86 para a lidocaína. A acetonitrila foi selecionada como solvente orgânico em conjunto com o sal acetato de amônio. O gráfico de Pareto feito com o software Minitab ® foi utilizado para identificar os fatores significativos para incluir no CCD. Os gráficos de superfície e o teste de desejabilidade feitos com o software Statistica ® foram utilizados para definir as condições ótimas de extração, as quais foram 500 µL de plasma, 1268 µL de acetonitrila, 384 µL da solução de acetato de amônio em uma concentração de 5 mol/L e 10 min de centrifugação. Nesta condição foi possível obter uma recuperação de 93% para ambos enantiômeros do carvedilol. O método desenvolvido foi validado seguindo os guias da ANVISA (2012) e EMA (2011) e apresentou seletividade, linearidade na faixa de 0,5 a 100 ng/mL, sendo 0,5 ng/mL o limite inferior de quantificação, precisão e exatidão. Não foi observado efeito residual e efeito matriz, e os enantiômeros do carvedilol apresentaram estabilidade em plasma após submetidos a diferentes condições de armazenamento, preparo e análise. Finalmente, o método validado foi aplicado com sucesso em amostras de plasma de pacientes do HCFMRP/USP que foram submetidos a cirurgia bariátrica, assim o método proposto atingiu o objetivo inicial.

Palavras-chave: carvedilol; metabólitos; plasma; SALLE; LC-MS/MS.

ABSTRACT

Pavan, M. G. **Análise enantiosseletiva do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS.** 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Carvedilol is a third-generation non-selective beta-blocker used to treat diseases such as hypertension, angina pectoris, cardiac arrhythmia, and congestive heart failure. It is marketed as a racemic mixture of the (S)-(-) and (R)-(+) enantiomers. Carvedilol is widely used in patients undergoing bariatric surgery, in the period before and after surgery. However, one of the consequences of this surgery is the compromised absorption of nutrients and drugs. So the determination of the plasma concentration of carvedilol in these patients is very important to make the dose adjustment. Most of the methods described in the literature for the quantification of carvedilol in plasma samples use sample preparation techniques such as protein precipitation, liquid-liquid extraction, solid support extraction, dispersive liquid-liquid microextraction and extraction in solid phase. To date, no method using salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) has been reported. Thus, the objective of this work was to develop and validate a method for the analysis of carvedilol enantiomers in human plasma using SALLE and LC-MS/MS analysis and apply this method in plasma samples from HCFMRP/USP patients undergoing bariatric surgery. The selection of the organic solvent and saline solution to be used in the extraction was based on qualitative tests. The identification of the parameters that influence the efficiency of SALLE was carried out using a fractional factorial design 2^{4-1} with 4 factors. Later, a central composite design (CCD) was used to optimize the optimal extraction condition. The chromatographic separation of carvedilol enantiomers and metabolites was performed on a Chirobiotic V/Astec column (0.46x25cmx 5 µm) coupled to a Lichrospher 100 RP-18 guard column (5µM, 4x4 mm). The mobile phase was composed of a mixture of methanol:ethanol (90:10, v/v) and 0.02% of diethylamine and 0.18% acetic acid, at a temperature of 21ºC and a flow rate of 0.6 mL/min. The positive mode of electrospray ionization (ESI+) was used and the transitions evaluated were m/z 407 → 100 for carvedilol and m/z 235 → 86 for lidocaine. Acetonitrile was selected as the organic solvent together with the ammonium acetate salt. The Pareto chart made with Minitab ® software was used to identify the significant factors to include in the CCD. Surface graphs and the desirability test done with the Statistica ® software were used to define the optimal extraction conditions, which were 500 µL of plasma, 1268 µL of acetonitrile, 384 µL of ammonium acetate solution at a concentration of 5 mol/L and 10 min of centrifugation. In this condition it was possible to obtain a 93% recovery for both enantiomers of carvedilol. The developed method was validated following guidelines of ANVISA (2012) and EMA (2011) and presented selectivity, linearity in the range of 0.5 to 100 ng/mL, with 0.5 ng/mL being the lower limit of quantification, precision and accuracy. Residual effect and matrix effect were not observed, and carvedilol enantiomers showed stability in plasma after being submitted to different storage, preparation and analysis conditions. Finally, the validated method was successfully applied to plasma samples from patients at HCFMRP/USP who underwent bariatric surgery, thus the proposed method achieved its initial objective.

Keywords: carvedilol; metabolites; plasma; SALLE; LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do carvedilol (* sendo o centro quiral).....2
Figura 2. Metabolismo do carvedilol (* sendo o centro quiral).....3
Figura 3. Estrutura química da Vancomicina.....6
Figura 4. Procedimento prático da SALLE.....10
Figura 5. Cromatograma referente a análise da solução padrão dos enantiômeros do carvedilol (200 ng/mL) e PI (50 ng/mL). Condições cromatográficas: fase móvel composta por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min.....29
Figura 6. Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) carvedilol (200 ng/mL da mistura racêmica), B) lidocaína (1 µg/mL) 31
Figura 7. Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do (S)-(-)-carvedilol utilizando a SALLE. A linha vertical define o nível de confiança de 95%. Elaborado pelo autor utilizando o programa Minitab®.....35
Figura 8. Gráfico de superfície de resposta da influência do tempo de centrifugação e do volume de ACN avaliados no CCD *versus* área do (S)-(-)-carvedilol. Elaborado pelo autor utilizando o programa Statistica®.....39
Figura 9. Gráfico de superfície de resposta da influência do tempo de centrifugação e do volume de solução de acetato de amônio avaliados no CCD *versus* área do (S)-(-)-carvedilol. Elaborado pelo autor utilizando o programa Statistica®.....40
Figura 10. Gráfico de desejabilidade para a área do (S)-(-)-carvedilol.....41
Figura 11. Cromatograma de plasma branco. Condições cromatográficas: fase móvel composta por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min. 42
Figura 12. a) Cromatograma obtido para o LIQ **b)** Zoom do cromatograma. Condições cromatográficas: fase móvel composto por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min. 43
Figura 13. a) Cromatograma referente a uma amostra de plasma de um paciente coletada 1h após a administração de 25 mg de carvedilol **b)** Zoom do cromatograma.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para determinação enantiosseletiva do carvedilol em amostras biológicas (pesquisa realizada a partir de 2000 na base de dados *web of science*).....7
Tabela 2. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da SALLE....21
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (n=3) 22
Tabela 4. Fatores e níveis utilizados no CCD.....23
Tabela 5. Matriz do CCD 2^3 para a seleção da condição ótima de extração por SALLE.....23
Tabela 6. Concentrações de cada enantiômero do carvedilol nos controles de qualidade.....24
Tabela 7. Parâmetros selecionados para análise do carvedilol e lidocaína por MS/MS.....31
Tabela 8. Combinação dos solventes e sais no procedimento da SALLE e as respostas qualitativas observadas.....32
Tabela 9. Coeficientes do modelo de superfície de resposta para o (S)-(-)-carvedilol.....37
Tabela 10. Tabela ANOVA do modelo de superfície de resposta para o (S)-(-)-carvedilol.....37
Tabela 11. Condições da extração dos enantiômeros do carvedilol por SALLE em amostras de plasma.....42
Tabela 12. Efeito matriz para o (S)-carvedilol, (R)-carvedilol e PI.....44
Tabela 13. Parâmetros da curva de calibração do método para análise do (S)-carvedilol.....45
Tabela 14. Precisão e exatidão intercorridas e intracorridas para a análise do (S)-carvedilol e (R)-carvedilol.....46
Tabela 15. Estabilidade para a análise do (S)-carvedilol e (R)-carvedilol.....47
Tabela 16. Estabilidade dos enantiômeros do carvedilol e do PI em solução.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BBD - *Box-Behnken design*

CCD - *Central Composite Design*

CE - *Capillary Electrophoresis*

CE – Energia de Colisão

CFD - *Complete Factorial Design*

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CQA – controle de qualidade de alta concentração

CQB – controle de qualidade de baixa concentração

CQD – controle de qualidade de diluição

CQLIQ - limite inferior de quantificação

CQM – controle de qualidade de média concentração

CV% - Coeficiente de Variação

DLLME - *Dispersive Liquid Liquid Microextraction*

DPR – Desvio Padrão Relativo

EPR – Erro Padrão Relativo

ESI – fonte de ionização por eletrospray

FDA - *Food and Drug Administration*

FEQ - Fase Estacionária Quiral

FFD - *Fractional Factorial Design*

FMN – Fator de Matriz Normalizado

HEMAC - Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco, na cidade de Ribeirão Preto – SP

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IC_{50} - Concentração de uma substância que reduz em 50% a viabilidade celular

LC-MS/MS - *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

LLE - Liquid Liquid Extraction

m/z - Razão entre a massa e a carga dos íons

MIN – Minutos

MRHD - Dose Máxima Recomendada Humana

MRM - Multiple Reaction Monitoring

OFAT - *One-Factor-At-A-Time*

PI – Padrão Interno

RSM - *Response Surface Methodology*

SALLE - *Salting out Assisted Liquid-Liquid Extraction*

SLE - *Supported Liquid Extraction*

SPE - *Solid Phase Extraction*

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

(R)-(+)-carvedilol

(S)-(-)-carvedilol

® - Marca registrada

°C - Graus Célsius

4OHC - 4’-hidroxicarvedilol

5OHC - 5’-hidroxicarvedilol

8OHC - 8-hidroxicarvedilol

ACN – Acetonitrila

$C_{24}H_{26}N_2O_4$ – fórmula molecular do carvedilol

DL_{50} - dose necessária para matar 50% da população em teste

EtOH – Etanol

IPA – Isopropanol

MeOH – Metanol

ODMC - O-desmetilcarvedilol

THF – Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT.....ii
LISTA DE FIGURAS.....iii
LISTA DE TABELAS.....iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....vi
LISTA DE SÍMBOLOS.....vii

1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Carvedilol.....2
1.2 Análise enantiosseletiva.....5
1.3 Extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE).....9
1.4 Delineamento Experimental.....11

2. OBJETIVOS.....14
2.1 Objetivos gerais.....15
2.2 Objetivos específicos.....15

3. **MATERIAIS E MÉTODOS**.....16
3.1 Equipamentos.....17
3.2 Coluna cromatográfica.....17
3.3 Reagentes e Solventes.....18
3.4 Padrão Interno.....18
3.5 Soluções padrão.....18
3.6 Obtenção e preparo das amostras de plasma.....19
3.7 Avaliação das condições para análise dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos por LC-MS/MS.....19
3.8 Avaliação das condições de extração por SALLE dos enantiômeros do carvedilol em plasma.....20
3.8.1 Seleção do solvente orgânico extrator e solução salina.....21
3.8.2 Otimização do método de extração.....21

3.8.3 Seleção da condição ótima de extração.....22
3.9 Validação do método.....24
3.9.1 Seletividade.....24
3.9.2 Efeito residual.....25
3.9.3 Efeito matriz.....25
3.9.4 Curva de Calibração.....25
3.9.5 Precisão.....26
3.9.6 Exatidão.....26
3.9.7 Estabilidade.....26
3.10 Aplicação do método.....27

4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO.....28**
4.1 Avaliação das condições para análise dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos por LC-MS/MS.....29
4.2 Otimização das condições de extração por SALLE dos enantiômeros do carvedilol em plasma.....32
4.2.1 Seleção do solvente orgânico extrator e solução salina.....32
4.2.2 Otimização das condições de extração.....33
4.2.2.1 Planejamento fatorial fracionário.....34
4.2.3 Seleção da condição ótima de extração.....36
4.3 Validação do método.....42
4.3.1 Seletividade.....42
4.3.2 Efeito residual.....44
4.3.3 Efeito matriz.....44
4.3.4 Curva de Calibração.....44
4.3.5 Precisão e Exatidão.....45
4.3.6 Estabilidade.....46
4.4 Aplicação do método.....48

5. CONCLUSÕES 50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....52
ANEXOS.....59

1. INTRODUÇÃO

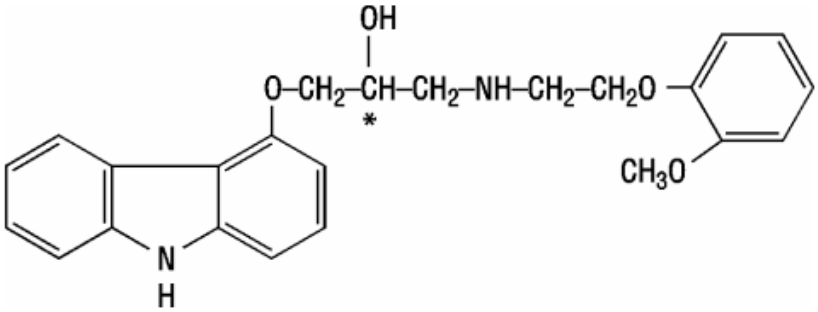
1.1. Carvedilol

O carvedilol é um fármaco betabloqueador não seletivo de terceira geração, sendo capaz de bloquear os receptores periféricos α_1- adrenérgicos causando um efeito vasodilatador, levando a redução da pressão arterial ao diminuir a resistência vascular periférica (BORTOLOTTO; CONSOLIM-COLOMBO, 2009).

Devido a sua atividade betabloqueadora, esse fármaco é atualmente utilizado no tratamento de doenças como hipertensão, angina pectoris, arritmia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (HONDA et al., 2005; PACKER et al., 1996). Os efeitos citotóxicos em linhagens celulares de câncer humano e a redução do risco de câncer também podem ser citados como outros efeitos benéficos do carvedilol (STANOJKOVIC et al., 2005).

O carvedilol (figura 2) é comercializado com o nome COREG®, o qual é administrado por via oral como uma mistura racêmica dos enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+). Sua denominação química é (±)-1-(carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(o-metoxifenoxi)etil]amino]-2-propanol, possui fórmula molecular $C_{24}H_{26}N_2O_4$ e massa molecular de 406,5 g/mol. Apresenta-se sob a forma de pó branco ou creme. É uma amina secundária e possui valor de pka de 7,8, sendo praticamente insolúvel em água e nos fluidos gástrico e intestinal (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016; LOFTSSON et al., 2008)

Figura 1- Estrutura química do carvedilol (* sendo o centro quiral)



Retirado de (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016)

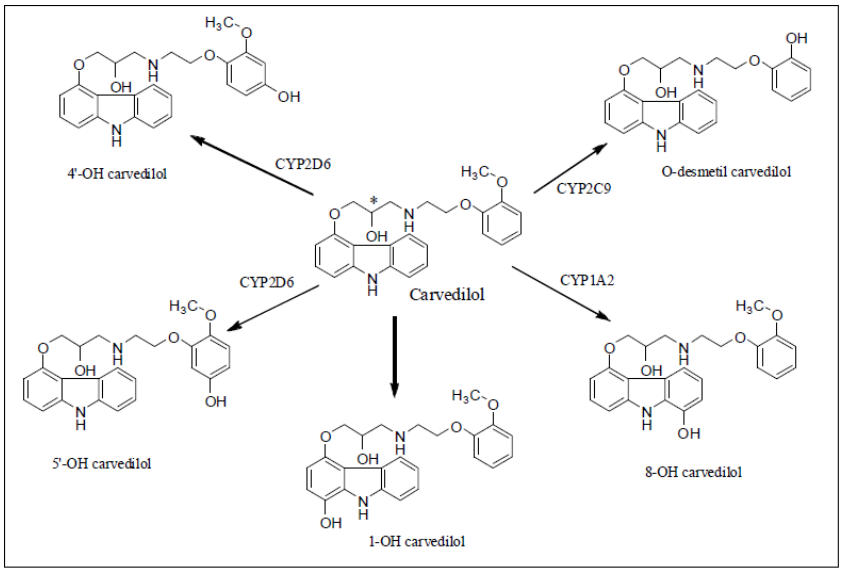
Os enantiômeros do carvedilol apresentam perfis farmacológicos diferentes, ambos (S)-(-) e (R)-(+), possuem atividade alfabloqueadora, mas apenas o (S)-(-) é responsável pela atividade betabloqueadora (STOSCHITZKY et al., 2001).

Após ser ingerido oralmente, o carvedilol tem absorção rápida no trato gastrointestinal assim como os demais betabloqueadores, e a concentração plasmática máxima é atingida em 1 a 2 horas. Seu volume de distribuição é de aproximadamente 2 L/kg e 98% se liga às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, sendo que o enantiômero (R)-(+)- carvedilol apresenta maior ligação (SAITO et al., 2006; ZARGHI et al., 2007).

O (R)-(+)-carvedilol possui biodisponibilidade oral duas vezes maior do que o (S)-(-)-carvedilol, o que indica a enantiosseletividade no efeito de primeira passagem. Há também uma maior concentração plasmática do enantiômero (R)-(+) do que do (S)-(-) (aproximadamente três vezes maior) (MORGAN, 1994; TENERO et al., 2000).

Estudos realizados com microssomos de fígado e intestino humano mostram que as duas principais vias de metabolização do carvedilol são a oxidação e a conjugação, e os principais metabólitos são 4'-hidroxicarvedilol (4OHC), 5'-hidroxicarvedilol (5OHC), 8-hidroxicarvedilol (8OHC) e O-desmetilcarvedilol (ODMC). A figura 3 representa os caminhos de metabolização do carvedilol (OLDHAM; CLARKE, 1997).

Figura 2- Metabolismo do carvedilol (* sendo o centro quiral)



Retirado de (OLDHAM; CLARKE, 1997)

O metabólito 4OHC possui atividade betabloqueadora aproximadamente 13 vezes maior do que o próprio carvedilol. Enquanto os três metabólitos ativos 4OHC, 5OHC e ODMC apresentam pequena capacidade vasodilatadora, com concentrações plasmáticas de um décimo

quando comparadas ao carvedilol, e farmacocinética semelhante à dele (GLAXOSMITHKLINE, 2011).

A via de eliminação do carvedilol é principalmente biliar, e apenas 2% é eliminado inalterado pelos rins. O *clearance* plasmático está entre 500 a 700 mL/min e possui meia vida de eliminação de 7 a 10 horas após a administração oral (GEHR et al., 1999; ZHOU; WOOD, 1995).

O metabolismo e a farmacocinética do carvedilol podem ser afetados pela indução ou inibição das enzimas do citocromo P450, uma vez que ele sofre metabolismo oxidativo substancial. A administração concomitante de clonidina ou inibidores do CYP2C9 ou de glicosídeos cardíacos com um agente betabloqueador como o carvedilol, pode potencializar os efeitos de redução da pressão arterial e da frequência cardíaca aumentando o risco de bradicardia. Além disso, interações medicamentosas com a rifampicina podem reduzir as concentrações plasmáticas de carvedilol em até 70%. O carvedilol também pode aumentar o efeito da insulina e dos hipoglicêmicos orais na redução de açúcar no sangue, devido sua ação betabloqueadora (GLAXOSMITHKLINE, 2011).

O carvedilol exibe farmacocinética flip-flop provavelmente devido à sua absorção limitada pela baixa solubilidade (GARRISON; SAHIN; BENET, 2015). Entre os betabloqueadores, o carvedilol é o inibidor da glicoproteína P mais potente, sendo o principal mecanismo a interação carvedilol-digoxina, além disso o carvedilol é substrato da glicoproteína P indicando que a variabilidade interindividual desse fármaco pode ser explicado em parte pela função da glicoproteína P (BACHMAKOV et al., 2006).

Estudos do FDA (Food and Drug Administration) realizados em ratos ao longo de dois anos mostraram que o carvedilol não apresentou efeitos carcinogênico e genotóxico. Apenas em doses 32 vezes maior do que a Dose Máxima Recomendada Humana (MRHD) o carvedilol causou um efeito tóxico. Os efeitos teratogênicos surgiram em doses 10 vezes maiores que o MRHD em ratos e em coelhos surgiram em doses 5 vezes maiores que o MRHD. Não há estudos adequados e bem controlados em mulheres grávidas, dessa maneira o carvedilol só deve ser utilizado durante a gravidez se o benefício potencial justificar o risco potencial para o feto (ADMINISTRATION, 2016).

A DL_{50} (dose necessária para matar 50% da população em teste) do carvedilol em ratos foi superior a 8000 mg/kg. A sobredosagem pode causar hipotensão, bradicardia, insuficiência cardíaca, choque cardiogênico e parada cardíaca (GLAXOSMITHKLINE, 2011).

Na clínica o carvedilol é amplamente utilizado em pacientes hipertensos. Neste contexto, um grupo especial de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica fazem uso do carvedilol no período anterior e posterior à cirurgia. Entretanto, uma das consequências da cirurgia bariátrica é o comprometimento da absorção de nutrientes devido a diminuição do tamanho do estômago e da superfície intestinal em contato com o alimento. Além disso, há alteração na fisiologia e pH do aparelho digestivo o que pode comprometer também a absorção de alguns fármacos (BORDALO et al., 2011; GORDON; KAIO; SALLET, 2011). Assim, a determinação das concentrações plasmáticas do carvedilol nestes pacientes é de grande importância clínica, uma vez que a dose poderá ser ajustada de acordo com a concentração plasmática do paciente, evitando doses subterapêuticas. Assim, para que seja possível analisar e quantificar separadamente os enantiômeros do carvedilol é necessário desenvolver um método para análise enantiosseletiva deste fármaco.

1.2. Análise enantiosseletiva

Uma coluna cromatográfica é utilizada para a separação quiral é chamada de Fase Estacionária Quiral (FEQ), e possibilita a separação dos enantiômeros através da formação de complexos diastereoisoméricos transitórios, que ocorre pela interação entre os enantiômeros e o material da fase quiral. Os complexos formados possuem diferentes estabilidades e, portanto, diferentes tempos de retenção, o que possibilita a separação isomérica (MARTINS et al., 1991).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography)* com fase estacionária quiral é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a separação dos enantiômeros. A teoria mais aceita para explicar o mecanismo de separação é a dos três pontos de ligação, segundo na qual são necessárias no mínimo três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e a FEQ, sendo uma delas estereoespecífica, para que exista a resolução dos enantiômeros. O outro enantiômero interage com apenas dois sítios (DALGLIESH, 1952).

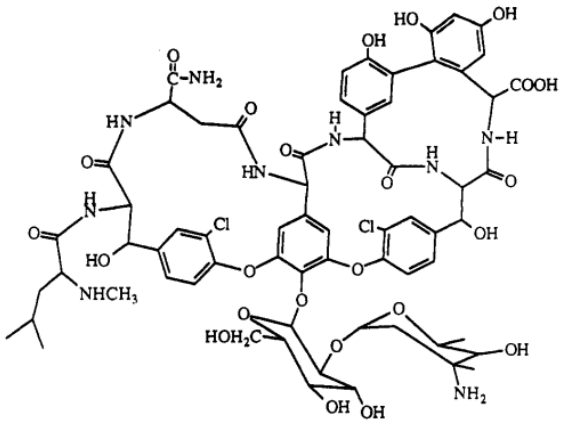
As principais interações que possibilitam a separação dos enantiômeros são: interação estérica e coulômbica e ligação de hidrogênio que são interações muito fortes, π-π e íon dipolo que são interações fortes, dipolo-dipolo que possui intensidade intermediária, dipolo-dipolo induzido que é uma interação fraca e dispersão de London que tem intensidade muito fraca (BERTHOD, 2006).

Entre as colunas quirais disponíveis atualmente para HPLC pode-se citar aquelas com fase estacionária de ciclodextrina, proteínas, polissacarídeos e antibióticos macrocíclicos. Aqui será discutida apenas a fase quiral de antibióticos, a qual foi utilizada nesse trabalho.

Com base na capacidade estereosseletiva das ciclodextrinas, Armstrong et al. (1994) investigaram outros compostos naturais macrocíclicos baseados em propriedades de complexação de inclusão, e nesse estudo foi desenvolvida a fase estacionária de antibióticos macrocíclicos (ARMSTRONG et al., 1994).

Nove antibióticos são utilizados como seletores quirais: vancomicina, teicoplanina, teicoplanina aglicona, tiostrepton, rifamicina B, canamicina, estreptomicina, fradiomicina e ristocetina A (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002). A vancomicina (figura 1) foi o seletor quiral utilizado nesse estudo.

Figura 3- Estrutura química da Vancomicina



Retirado de (ARMSTRONG et al., 1994).

A estrutura complexa dos antibióticos macrocíclicos possui cavidades quirais e diferentes grupos funcionais, por isso a enantiosseparação pode ocorrer através de diferentes mecanismos, no qual a fase móvel é responsável por determinar qual será o mecanismo da separação. Dentre eles, tem-se a formação de complexos de inclusão, formação de ligação de hidrogênio, formação de interações π-π, estéricas, eletrostáticas, dipolo-dipolo e dispersão de London (LOURENÇO et al., 2010).

A molécula de vancomicina contém 18 centros quirais e 3 cavidades preenchidas com cinco estruturas aromáticas em anel, além de possuir vários grupos funcionais responsáveis pela

natureza enantiosseletiva, como carboxila, hidroxila, amina. A vancomicina tem sido amplamente utilizada na resolução de enantiômeros por reconhecê-los de maneira muito eficaz dentre os compostos aniônicos, especialmente os que contém grupos carboxila, devido a presença de grupos amina em sua estrutura (ABOUL-ENEIN; ALI, 2000).

Alguns métodos enantiosseletivos foram desenvolvidos para a determinação do carvedilol em plasma humano utilizando diferentes técnicas analíticas (Tabela 1), como o HPLC, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) são algumas das técnicas utilizadas.

Dentre as técnicas de preparo de amostras utilizadas estão a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid liquid extraction*), a extração em suporte sólido (SLE, do inglês *supported liquid extraction*), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid liquid microextraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*).

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para determinação enantiosseletiva do carvedilol em amostras biológicas (pesquisa realizada a partir de 2000 na base de dados *web of science*)

Autores	Técnica de análise	Tipo de extração	Matriz	Análise enantiosseletiva	LIQ	Volume de amostra
(PECCININI et al., 2008)	HPLC	LLE	Plasma e urina	Derivatização quiral + coluna C18	0,25 ng/mL (S)-(-)-carvedilol e 0,50 ng/mL (R)-(+)-carvedilol	1000 µL
(YANG et al., 2004)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	Derivatização quiral + coluna C18	0,2 ng/mL para ambos enantiômeros	150 µL
(POGGI et al., 2012)	LC-MS/MS	LLE	Plasma	Chirobiotic T®	0,2 ng/mL para ambos enantiômeros	1000 µL
(NARDOTTO et al., 2016)	LC-MS/MS	LLE	Plasma	Chirobiotic V®	0,05 ng/mL para ambos enantiômeros	1000 µL
(ZAKRZEWSKI JAKUBIAK et al., 2010)	HPLC	LLE	Plasma	Derivatização quiral + coluna C18	0,5 ng/mL para ambos enantiômeros	100 µL

(JIANG et al., 2014)	LC-MS/MS	LLE	Plasma	Sino-Chiral AD	0,08 ng/mL para ambos enantiômeros	500 µL
(SAITO et al., 2006)	HPLC-FL	LLE	Plasma e sangue	Chiralpak AD	0,5 ng/mL	50 µL
(FURLONG et al., 2012)	LC-MS/MS	SLE	Plasma	Derivatização quiral + coluna C18	0,2 ng/mL	200 µL
(ANNY et al., 2017)	HPLC-DAD	PT-MIP-SPE	Urina	Chiralpak IA	20 ng/mL	500 µL
(HAMIDI; SOLTANI; JOUYBAN, 2015)	CE-DAD	DLLME	Plasma	Derivatização quiral	12,5 ng/mL	500 µL
(MAGIERA; ADOLF; BARANOWSKA, 2013)	LC-MS/MS	SPE	Urina	Chiralcel OD-RH	25 ng/mL	3 mL
(BEHN et al., 2001)	CE-LIF	LLE	Plasma	Derivatização quiral	1,56 ng/mL	100 µL

HPLC: High performance liquid chromatography; LC-MS/MS: Liquid chromatography–mass spectrometry; HPLC-FL: High performance liquid chromatography–fluorescence; LLE: Liquid–liquid extraction; SLE: Supported liquid extraction; HPLC-DAD: High performance liquid chromatography–Diode Array Detector; PT-MIP-SPE: pipette tip based on molecularly imprinted polymers solid phase extraction; CE-DAD: Capillary electrophoresis- Diode Array Detector; DLLME: dispersive liquid liquid microextraction; SPE: Solid phase extraction; CE-LIF: Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence.

A maior parte dos métodos disponíveis na literatura que fazem a determinação do carvedilol em amostras biológicas não realizam a determinação enantiosseletiva, porém é de extrema importância determinar as concentrações desses no plasma para que seja possível conhecer as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos enantiômeros para aplicação clínica, uma vez que estes podem interagir de maneiras diferentes com macromoléculas quirais, como proteínas transportadoras, receptores e enzimas, tornando processos como distribuição, absorção, metabolismo e excreção diferente para cada um deles.

Dentre os métodos que realizam a análise enantiosseletiva a maioria utiliza técnicas de extração convencionais como a LLE ou a derivatização quiral, e ambas apresentam diversas desvantagens. Assim, o desenvolvimento de métodos que reduzem o consumo de solventes

orgânicos e o volume da amostra, e utilizam solventes menos agressivos ao meio ambiente é importante e atrativo e está em acordo com o princípio da química verde. Portanto, esse projeto visa utilizar, pela primeira vez, a extração líquido liquido assistida por salting out (SALLE) para extração dos enantiômeros do carvedilol em plasma.

1.3. Extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE)

A extração líquido-líquido assistida por *salting out*, SALLE (do inglês *Salting out Assisted Liquid-Liquid Extraction*), foi demonstrada pela primeira vez no ano de 1973 por Matkovich e Christian, os quais testaram 79 compostos como agentes de *salting out* para a extração de quelatos metálicos de água utilizando acetona (MATKOVICH; CHRISTIAN, 1973). Embora seja uma técnica antiga, apenas recentemente ela foi utilizada em análises por LC-MS em amostras biológicas.

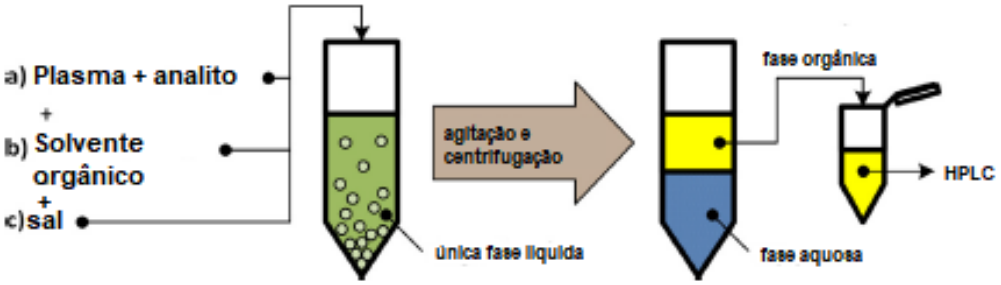
A SALLE é baseada no efeito de *salting out*, o qual é definido como a adição de um eletrólito a uma solução aquosa de maneira a modificar a taxa de distribuição de um dado soluto entre duas fases. Além disso esse termo também é utilizado quando ocorre a adição de eletrólitos para reduzir a miscibilidade mútua entre dois líquidos (RICE; IRVING; LEONARD, 1993).

O *salting out* é então responsável por separar as fases orgânica e aquosa, que em condições normais são miscíveis e formam um sistema monofásico. Essa separação ocorre porque ao adicionar um sal em uma mistura de dois líquidos, como água e acetona, um dos solventes solvata preferencialmente o eletrólito, tornando-o indisponível para solvatar o outro solvente. Deve-se levar em conta três princípios para a escolha do sal: (1) a solubilidade do sal no solvente orgânico deve ser desprezível, (2) a solubilidade do sal na água deve ser a mais alta possível e (3) a capacidade de *salting out* dos sais segue a série liotrópica (ou série de Hofmeister) (RICE; IRVING; LEONARD, 1993; VALENTE, 2014).

Ademais, a adição do sal faz com que os analitos orgânicos não carregados presentes na amostra tenham sua solubilidade na fase aquosa reduzida, e assim migram para a fase orgânica. Dessa maneira com a SALLE é possível realizar a extração de analitos presentes em matrizes biológicas (JAIN et al., 2014).

Na prática, em um procedimento típico SALLE, um solvente orgânico miscível em água e uma solução concentrada de sal são adicionados à matriz biológica contendo o analito de interesse. Após agitação e centrifugação, ocorre a formação de uma fase orgânica superior à fase aquosa, os analitos são extraídos para a fase orgânica, a qual pode ser injetada diretamente ou após diluição no sistema cromatográfico (TANG; WENG, 2013). A Figura 4 demonstra esse procedimento na prática.

Figura 4- Procedimento prático da SALLE



Adaptado de (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013)

A SALLE apresenta diversas vantagens com relação às técnicas de preparo de amostras mais utilizadas convencionalmente, como a precipitação proteica, a LLE e a SPE, uma vez que é capaz de extrair uma grande variedade de compostos de alta e baixa polaridade utilizando apenas o solvente orgânico e um sal orgânico ou inorgânico (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). Com relação à precipitação proteica, apesar de ter a mesma simplicidade, gera extratos mais limpos. Ao contrário da LLE, a SALLE vai ao encontro com os propósitos da química verde devido a menor quantidade de solvente orgânico utilizado, e também pelo fato de utilizar solventes menos agressivos ao meio ambiente, além disso tem vantagens como extrair os analitos com polaridade alta e em alguns casos a possibilidade de injetar o extrato diretamente ou apenas diluído no sistema cromatográfico. Já em comparação com a SPE offline, a SALLE possui menor custo, e é mais simples e rápida (WU et al., 2008).

A eficiência do método SALLE é influenciada por diversos fatores, entre eles estão o solvente orgânico e o sal a serem utilizados, o tipo de amostra, o volume de solvente orgânico e de solução salina, o tempo de centrifugação e o pH.

Os solventes orgânicos mais utilizados são: isopropanol (IPA) e outros álcoois como metanol (MeOH) e etanol (EtOH), os quais apresentam alta eficiência de extração de fármacos

e metabolitos básicos, porém coextraem componentes da matriz ; tetrahidrofurano (THF), o qual possui a separação de fases mais completa e extratos mais limpos devido a sua baixa polaridade; e a acetonitrila (ACN) que apresenta alta eficiência de extração e extratos limpos com baixo conteúdo de água na fase orgânica (TANG; WENG, 2013).

O sal utilizado pode ter natureza orgânica ou inorgânica, sendo mais utilizados o sulfato de magnésio, sulfato de zinco, sulfato de amônio, acetato de amônio e sulfato de cobre. Para sua escolha deve-se seguir os três princípios descritos anteriormente, e levar em conta o tipo de amostra biológica, a natureza do analito, o solvente orgânico e a instrumentação analítica utilizada. Com relação a instrumentação analítica, por exemplo, ao se utilizar LC-MS/MS é preferível o uso de sais voláteis como o acetato e formiato de amônio (GRECCO et al., 2019).

Como diversos fatores podem afetar a eficácia da SALLE, foi utilizado o delineamento experimental para otimizar os parâmetros referentes à extração.

1.4 Delineamento Experimental

O método utilizado para planejar e executar experimentos, que geralmente envolve vários fatores, é chamado de estratégia de experimentação. Uma das estratégias mais utilizadas é a univariada (OFAT, do inglês *one-factor-at-a-time*), na qual um fator escolhido é analisado em diferentes níveis enquanto os demais são mantidos em valores fixos e assim sucessivamente para todos os fatores (MONTGOMERY, 2013). Entre as desvantagens dessa estratégia estão a incapacidade de avaliar os efeitos das interações entre os fatores sobre a resposta, o alto número de experimentos, de consumo de reagentes e tempo das análises, aumentando assim o custo (BEZERRA et al., 2008).

Como forma de resolver esses problemas utiliza-se a estratégia multivariada, também chamada de delineamento experimental, na qual os diversos fatores são simultaneamente otimizados, sendo possível analisar os efeitos de suas interações. O delineamento experimental inclui técnicas quimiométricas e programas estatísticos com o objetivo de guiar o pesquisador (ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2013). Essa estratégia vem sendo muito utilizada na área de química analítica para a otimização das técnicas de extração (BENEDETTI; CARRO; MAGI, 2018; FUSARI; RAMIREZ; CAMARGO, 2019; SEIRA et al., 2013; WANG; YIN; XU, 2013).

Os delineamentos são divididos entre os de primeira e de segunda ordem. Os de primeira ordem são aqueles nos quais é realizada a triagem dos fatores a fim de se obter quais são significativos na resposta desejada (MONTGOMERY, 2013). Em complemento, os delineamentos de segunda ordem são realizados após a seleção dos fatores significantes, e devido à sua complexidade podem ser utilizados para obter as condições otimizadas do método (FERREIRA et al., 2007).

O delineamento fatorial completo (CFD, do inglês *complete factorial design*) e o delineamento fatorial fracionado (FFD, do inglês *fractional factorial design*) são exemplos de delineamento de primeira ordem (MONTGOMERY, 2013). O número de níveis e fatores determina o total de ensaios a serem realizados, porém o delineamento fatorial mais comum é aquele com 2 níveis e k fatores, 2^k = número de ensaios. É comum codificar os 2 níveis utilizando os sinais (+) para o nível alto e (-) para o nível baixo, os quais estão relacionados com valores reais dos fatores, permitindo ilustrar o delineamento sob forma de matrizes de planejamento (GALDÁMEZ, 2002; MACEDO, 2007).

O CFD é utilizado quando há pelo menos quatros fatores a serem estudados e ele possui algumas limitações como: grande número de ensaios a serem realizados o que além de aumentar o custo e o tempo de desenvolvimento, pode impossibilitar as réplicas dos experimentos não podendo assim estimar os erros experimentais e também não é possível obter informações em níveis intermediários. A solução encontrada para essas limitações é a realização do FFD, onde se tem 2^{k-p} ensaios, e se realiza apenas uma fração específica do completo (podendo ser ½ fração quando p=1 e ¼ fração quando p=2), sem comprometer as conclusões dos resultados (GALDÁMEZ, 2002). Por isso, neste trabalho foi utilizado o FFD.

Nos exemplos de delineamentos de segunda ordem estão: o delineamento de Doehlert, o delineamento composto central (CCD, do inglês *central composite design*) e o delineamento de Box-Behnken (BBD, do inglês *Box-Behnken design*) (FERREIRA et al., 2007). Entre estes, o utilizado neste trabalho foi o CCD.

O CCD é um dos delineamentos mais utilizados, sendo capaz de gerar modelos quadráticos completos. Ele é formado por um delineamento fatorial 2^f (podendo ser completo ou fracionado), adicionado de pontos estrela e pelo menos um ponto central (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011). Os pontos estrela estão localizados em $+\alpha$ e $-\alpha$ com relação ao centro, e α pode ser calculado por $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ (NOVAES et al., 2017). Assim, todos os fatores são estudados em cinco níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) (BEZERRA et al., 2008). O número total de

experimentos é $N=k^2 + 2k+ pc$, onde pc é o número de experimentos no ponto central (NOVAES et al., 2017).

A partir dos resultados obtidos com o CCD pode-se obter a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface methodology*) e definir a condição ótima do método a partir do cálculo da desejabilidade (BEZERRA et al., 2008).

A RSM consiste em um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas que se fundamentam no ajuste de modelos empíricos aos dados experimentais obtidos no delineamento. O sistema estudado é descrito por funções polinomiais lineares ou quadráticas, a partir das quais podem ser gerados gráficos onde se pode explorar as condições experimentais até a sua otimização, ou seja, encontrar os valores ótimos para cada fator (BEZERRA et al., 2008).

O cálculo da desejabilidade tem sido muito utilizado em sistemas analíticos que envolvem diversas respostas. Nele, os valores obtidos nas superfícies de resposta são transformados em uma escala adimensional a qual varia de d=0, para uma resposta completamente indesejável e d=1 para uma resposta totalmente desejada. A desejabilidade total D é calculada através da média geométrica das desejabilidades individuais, e então um algoritmo é aplicado à função D para obter os valores de cada fator que a maximizam (FERREIRA et al., 2007).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Desenvolver e validar um método para análise dos enantiômeros do carvedilol em plasma humano por SALLE/LC-MS/MS e aplicar o método em amostras de plasma de pacientes que realizaram a cirurgia bariátrica.

2.2. Objetivos específicos

a) Otimizar as condições para análise dos enantiômeros do carvedilol por LC-MS/MS;

b) Otimizar, utilizando delineamento experimental, a SALLE como técnica de preparo de amostra para extração dos enantiômeros do carvedilol em amostras de plasma;

c) Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade;

d) Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de plasma de pacientes do HCFMRP/USP que serão submetidos a cirurgia bariátrica.

3. Material e Métodos

3.1. Equipamentos

Para a determinação das condições analíticas por LC-MS/MS foi empregado um Prominence HPLC modelo Shimadzu (Kyoto, Japão), que consiste em um sistema com injetor automático SIL-20ACHT, uma bomba LC-20AD, um controlador de sistema CBM-20A, um degaseificador online DGU-20A3R e um forno CTO-20AC, um espectrômetro de massas Triplo Quadrupolo (API 3200) (AB Sciex, Toronto Canada), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram tratados usando o software Analyst software, version 1.5.2 (Ontario, Canada).

Já para o desenvolvimento e otimização da SALLE foi empregado um cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) composto por uma bomba LC-20T, injetor SIL-10AF, forno CTO-20A, detector SPD-M20A, controladora CBM-20A, desgaseificador DGU-20A5R, válvula LPGE Kit e software LabSolutions.

Todos os padrões utilizados no preparo das soluções foram pesados em balança analítica Sartorius modelo MSU225P (Goettingen, Alemanha). Um aparelho de ultrassom, modelo Soni clean 2PS (Santa Rita do Sapucaí, Brasil) foi empregado na desgaseificação das soluções. Para homogeneizar as soluções, um agitador de tubos Ika modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha) foi utilizado. A água ultrapura utilizada para o preparo das soluções foi obtida do sistema de purificação da Gehaka® (São Paulo, Brasil). Também foi utilizada uma centrífuga (marca Hitachi e modelo HIMAC CF 15D2, Tóquio, Japão) para a realização da centrifugação das amostras submetidas à extração.

3.2. Coluna cromatográfica

A coluna utilizada nesse trabalho foi a Chirobiotic V/Astec (0,46x25cmx 5 μm) da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil) acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100 RP-18 (5μm, 4x4 mm) da Merck® (Rio de Janeiro, Brasil).

3.3. Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) avaliados no procedimento de preparo de amostra por SALLE foram o acetato de amônio (Dinâmica Química, Diadema, Brasil) e o formiato de amônio (Acros Organics, Nova Jersey, EUA).

Os solventes orgânicos (grau HPLC) avaliados no procedimento de preparo de amostra por SALLE foram ACN (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), THF (Synth, Diadema, Brasil), IPA (Merck, Darmstadt, Alemanha), a acetona (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), MeOH (J. T. Baker, Estado do México, México). O hidróxido de amônio (Synth, Diadema, Brasil) também foi utilizado no preparo de amostra.

O MeOH e EtOH (grau HPLC) utilizados para o preparo da fase móvel foram obtidos da J. T. Baker (Estado do México, México) e da Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. A dietilamina e o ácido acético, também utilizados no preparo da fase móvel foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) e da Dinâmica Química (Diadema, Brasil), respectivamente.

3.4. Padrão Interno

A adição do padrão interno (PI) tem como objetivo corrigir erros de variações de volumes de injeções e de manipulações da amostra, perdas relacionadas à evaporação do solvente e também melhorar a precisão (CASSIANO et al., 2009b).O PI deve ser similar ao analito de interesse, com tempos de retenção próximos, não reagir com o analito ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e ter alta pureza (RIBANI et al., 2004).

Dessa maneira, para a seleção do PI foram levados em conta os compostos que seguem os requisitos acima e que possuem pka próximo ao carvedilol, estando assim neutros no mesmo intervalo de pH, o que contribui para a extração.

3.5. Soluções padrão

O padrão analítico do carvedilol foi obtido da Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Canadá) e o padrão do PI foi obtido da Sigma Aldrich St. Louis, EUA).

As soluções estoque dos enantiômeros do carvedilol e do PI foram preparadas em metanol e guardadas em frascos âmbar a -20ºC para uso no preparo das soluções de trabalho nas concentrações de 1; 2 e 5 µg/mL de cada enantiômero do carvedilol, e 1 µg/mL para o PI, a serem utilizadas durante a otimização das condições para análise por LC-MS/MS e para a otimização das condições da SALLE.

Para a validação do método foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 1 e 2 µg/mL e 500; 50; 10 e 5,0 ng/mL de cada enantiômero do carvedilo, e 50 ng/mL da solução padrão de PI.

3.6. Obtenção e preparo das amostras de plasma

As amostras de plasma utilizadas para o desenvolvimento do método (branco de plasma, ou seja, plasma livre do fármaco em questão) foram obtidas por doação do Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco, na cidade de Ribeirão Preto - SP (HEMAC). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, faculdade proponente do projeto, em conjunto com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) (anexos 1,2 e 3). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Previamente à etapa de extração por SALLE, o plasma utilizado foi descongelado a temperatura ambiente e foi centrifugado a 1792 *g* por 15 minutos à 4°C para sedimentação de qualquer material particulado.

3.7. Avaliação das condições para análise dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos por LC-MS/MS

Para a separação cromatográfica dos enantiômeros do carvedilol, 4OHC, 5OHC e ODMC, diferentes proporções de solventes na fase móvel, temperaturas e vazões foram testados.

A avaliação das condições de MS/MS para a análise do carvedilol, 4OHC, 5OHC, ODMC e do PI foi realizada pela injeção das soluções individuais de cada padrão no espectrômetro de massas, no modo de ionização positivo. Foram feitas a identificação do íon

precursor e dos íons produtos, a seleção da energia de colisão (CE) e a voltagem do cone mais favoráveis para a análise.

As soluções de injeção, de cada padrão, foram obtidas por diluição das soluções de trabalho (1 mg/mL da mistura racêmica) na fase móvel, resultando em uma concentração de 200 ng/mL da mistura racêmica de carvedilol, 40 ng/mL da mistura racêmica do 4OHC, 5OHC e ODMC, e 1µg/mL do PI. A infusão foi realizada na vazão de 20 µL/min para o carvedilol e PI e 100 µL/min para o 4OHC,5OHC e ODMC em bomba seringa usando uma seringa (Hamilton, Reno, EUA). As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM - Multiple Reaction Monitoring) das moléculas protonadas [M–H]- e seus respectivos fragmentos.

3.8. Avaliação das condições de extração por SALLE dos enantiômeros do carvedilol em plasma

Para a avaliação das condições de extração, em um tubo de vidro de fundo redondo com boca esmerilhada, 500 µL de plasma, previamente centrifugado, foram fortificados com 50 µL de carvedilol (5000 ng/mL de cada enantiômero) e 50 µL de PI (100 µg/mL), resultando em uma concentração plasmática de 500 ng/mL de cada enantiômero de carvedilol e 10 µg/mL de PI. Após isto, foi adicionado o solvente orgânico e o tubo foi agitado a 3000 rpm por 30 segundos. A seguir foi adicionada a solução salina, solução aquosa do sal utilizado para o *salting out*, e 200 µL de hidróxido de amônio, para garantir o pH de 9. O tubo foi novamente agitado a 3000 rpm por 30 segundos e centrifugado à 5ºC, 1008*g*, para a separação da fase orgânica da fase aquosa. A fase orgânica foi separada e 800 µL foram transferidos para um tubo de fundo cônico. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo, redissolvido em 100 µL de fase móvel para a análise em HPLC-UV.

3.8.1 Seleção do solvente orgânico extrator e solução salina

A seleção do solvente orgânico e solução salina foi baseada em testes qualitativos, nos quais foram avaliadas a precipitação de proteínas, a separação de fases e a presença de sal na fase orgânica. A presença de sal, pode ser observada após a evaporação do solvente, verificando se há precipitação do sal. Para isso foi utilizado 1 mL de solvente orgânico e 250 µL de solução

salina, ficando em uma proporção de volume de plasma/solvente orgânico/solução salina de 2:4:1 (v/v/v) (XIONG et al., 2015).

Os solventes orgânicos testados foram: ACN, THF, ISOP, acetona e MeOH. Os sais testados foram o acetato e formiato de amônio, devido à volatidade e compatibilidade desses com o sistema de LC-MS/MS.

3.8.2 Otimização do método de extração

A identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da SALLE foi feita empregando o delineamento experimental. Foi realizado um planejamento fatorial fracionário ($2^{k-p} = 2^{4-1}$) de resolução IV com 4 fatores: A) volume de ACN, B) tempo de centrifugação, C) volume de solução salina D) concentração da solução salina. Foram avaliados dois níveis dos fatores apresentados e os experimentos foram realizados em triplicata, gerando uma matriz composta por 8 diferentes condições de extração (n=24). Os fatores e níveis deste planejamento estão dispostos na Tabela 2, e os experimentos gerados na Tabela 3. A área dos enantiômeros do carvedilol foram utilizadas como respostas e os resultados foram avaliados pelo software estatístico Minitab 18.0.

Tabela 2. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da SALLE

Variáveis	**Níveis**	
	Baixo (-1)	**Alto (+1)**
Volume de ACN (µL)	850	1000
Tempo de centrifugação (min)	10	15
Volume de solução salina (µL)	150	250
Concentração da solução salina (mol/L)	3	5

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (n=3)

Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**
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

3.8.3 Seleção da condição ótima de extração

Um CCD foi empregado para avaliar a condição ótima de extração. Os fatores volume de ACN (A), tempo de centrifugação (B) e volume de solução salina (C) foram incluídos no CCD para otimização das respostas máximas dos enantiômeros do carvedilol pelo método de extração por SALLE. A concentração salina foi fixada em 5 mol/L.

O CCD 2^3 (2 níveis com 3 fatores) foi realizado com 6 corridas axiais (pontos estrela) e 3 pontos centrais totalizando 17 experimentos ($2^3 + (2\times3) + 3=17$) realizados em triplicata (n = 51). O valor de α foi ± 1,682 para estabelecer a condição de rotabilidade. Os fatores e níveis deste planejamento estão dispostos na Tabela 4, e os experimentos gerados na Tabela 5. As áreas dos enantiômeros do carvedilol foram utilizadas como respostas e os resultados foram avaliados pelo software estatístico ou Statistica ®.

Tabela 4. Fatores e níveis utilizados no CCD

Fatores	Níveis			Pontos estrela (α=1,682)	
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)	- α	+ α
Volume de ACN (µL)	1000	1100	1200	932	1968
Tempo de centrifugação (min)	5	7	9	4	10
Volume de solução salina (µL)	250	300	350	216	384

Tabela 5. Matriz do CCD 2^3 para a seleção da condição ótima de extração por SALLE

Experimento	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.9. Validação do método

Após a otimização dos parâmetros de extração do carvedilol por SALLE em amostras de plasma a validação foi feita contemplando os ensaios de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade das amostras (congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração e pós processamento) e das soluções padrão (ANVISA, 2012; EMA, 2012).

Para a validação, foram preparadas as seguintes amostras de controle de qualidade: limite inferior de quantificação (CQLIQ), baixa (CQB), média (CQM), alta (CQA) e de diluição (CQD), as concentrações estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Concentrações de cada enantiômero do carvedilol nos controles de qualidade

Concentração	Concentração plasmática de cada enantiômero do carvedilol (ng/mL)
CQLIQ	0,5
CQB	1,0
CQM	50
CQA	80
CQD*	400

*CQD: as amostras foram diluídas na proporção de 1/5 em plasma branco antes do preparo de amostra.

3.9.1. Seletividade

Um método analítico é considerado seletivo quando é capaz de diferenciar os analitos e o padrão interno (PI) de componentes endógenos da matriz ou de outros componentes presentes na amostra (EMA, 2012). A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis fontes diferentes de amostra branco, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do CQLIQ (ANVISA, 2012).

A presença de outros fármacos possivelmente coadministrados aos pacientes não foi avaliada como interferentes, pois estes não apresentam a mesma razão massa carga (m/z) que o carvedilol e o PI.

3.9.2. Efeito residual

O efeito residual é responsável pelo aparecimento do sinal do analito em uma amostra branco causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (EMA, 2012). Ele foi avaliado pela injeção de três amostras de plasma branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada na concentração do limite superior de quantificação (LSQ).

A ausência de efeito residual é comprovada quando as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito são inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas na concentração do CQLIQ (ANVISA, 2012)

3.9.3. Efeito matriz

O efeito matriz é o efeito causado pelos componentes da matriz biológica na resposta do analito ou do PI (ANVISA, 2012). Ele foi avaliado utilizando-se oito amostras de plasma branco obtidas de fontes distintas sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Após as amostras de plasma branco serem processadas, elas foram fortificadas com o carvedilol nas concentrações equivalentes ao CQB e CQA e com o PI. Também foram analisadas soluções padrão em metanol do carvedilol nas concentrações de CQB e CQA adicionadas de PI.

Para cada amostra será obtido o fator de matriz normalizado (FMN), calculado separadamente para o carvedilol e PI, conforme a fórmula a seguir:

$$FMN = \frac{Resposta\ do\ analito\ em\ matriz}{Resposta\ do\ analito\ em\ solução}$$

O Desvio Padrão Relativo (DPR) dos FMN relativos às amostras de cada nível de controle deve ser inferior a 15%.

3.9.4. Curva de Calibração

A linearidade foi avaliada pela realização de três curvas de calibração para os enantiômeros do carvedilol, no intervalo de concentração plasmática de 0,5 a 100 ng/mL de cada enantiômero.

Foram empregadas alíquotas de 500µL de plasma branco enriquecidas com 50 µL das soluções padrão de carvedilol de 1 µg/mL; 500; 50; 10 e 5,0 ng/mL e 20 µL da solução padrão de 2 µg/mL.

Após a construção das curvas os dados serão analisados estatisticamente por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados obtendo assim a equação da reta e o coeficiente de correlação. A análise da adequação do modelo foi feita pela análise de variância ANOVA, calculando-se os valores de F e p para os analitos, com um nível de confiança de 95%. O programa Minitab Release versão 19 foi utilizado para realizar os cálculos estatísticos.

3.9.5. Precisão

A precisão de um método analítico descreve a proximidade entre as medidas. Ela foi determinada em quintuplicata e em pelo menos quatro concentrações diferentes CQLIQ, CQB, CQM e CQA. Foi avaliada em uma mesma corrida (precisão intraensaio) e em, no mínimo, três corridas em dias diferentes (precisão interensaio).

A precisão está expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula a seguir:

$$CV = \frac{Desvio\ Padrão}{Concentração\ média\ experimental}\ x\ 100$$

3.9.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade do valor de concentração obtido pelo método com a concentração nominal do analito. A exatidão também foi determinada em quintuplicata e em, no mínimo, quatro níveis de concentração (CQLIQ, CQB, CQM e CQA), para uma mesma corrida (precisão intraensaio) e em, no mínimo, três corridas em dias diferentes (precisão interensaio).

A exatidão está expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), segundo a fórmula a seguir:

$$EPR = \frac{Concentração\ média\ experimental - Valor\ nominal}{Valor\ nominal}\ x\ 100$$

3.9.7. Estabilidade

A estabilidade foi analisada em triplicata com amostras de plasma processadas e fortificadas com os analitos de interesse e o PI nas concentrações CQB e CQA. Ela foi avaliada através dos seguintes estudos:

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras de plasma foram congeladas a -20°C por 12 horas e depois descongeladas à temperatura ambiente, e congeladas novamente. Foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento. Depois dos ciclos, as amostras foram submetidas ao processo de extração e analisadas por LC-MS/MS.
- Estabilidade de curta duração: as amostras de plasma fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente por quatro horas, o qual é um tempo superior àquele em que as amostras são submetidas durante o procedimento de extração, em seguida as amostras foram submetidas ao processo de extração e analisadas por LC-MS/MS.
- Estabilidade de longa duração: as amostras de plasma fortificadas foram armazenadas a -20°C por 60 dias e então submetidas aos procedimentos de extração e analisadas por

LC-MS/MS. Esse tempo excede o intervalo de tempo em que as amostras dos pacientes ficarão armazenadas para posterior análise.

- Estabilidade pós-processamento: as amostras de plasma fortificadas foram submetidas aos procedimentos de extração e após 42 horas serão analisadas. Esse tempo compreende o intervalo entre o término de preparo das amostras em estudo e o fim da corrida analítica.

A quantificação das amostras submetidas aos testes de estabilidade foi realizada com o auxílio de uma curva de calibração analítica.

3.10. Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado na investigação dos enantiômeros do carvedilol em amostras de plasma de pacientes coletadas 12 meses após a realização da cirurgia bariátrica do tipo derivação gastrojejunal em Y de Roux (Roux-en-Y gastric bypass – RYGB) no HCFMRP-USP. Os pacientes concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (CAAE: 94756418.0.0000.5426) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HC-FMRP (CAAE: 94756418.0.3001.5440). Após jejum de 8 horas, os pacientes receberam uma dose única de 25mg de carvedilol. As amostras foram armazenadas a -20ºC até o momento da análise. Para a determinação da concentração plasmática dos enantiômeros do carvedilol foi utilizada uma curva de calibração recém preparada no intervalo de concentração de 0,5 – 100 ng/mL.

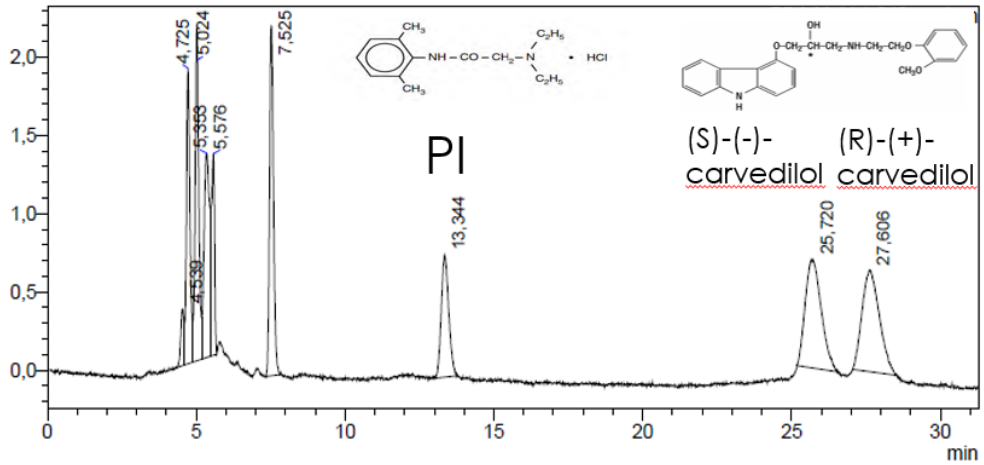
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das condições para análise dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos por LC-MS/MS

Inicialmente, foram avaliadas as condições cromatográficas com o intuito de realizar a separação dos enantiômeros do carvedilol. A fase móvel que apresentou melhor separação foi a composta por uma mistura de metanol:etanol (90:10, v/v) e 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, na temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min. Como demonstrado por Nardotto et al. (2016), em condições semelhantes a utilizadas neste trabalho e com a mesma coluna (Chiralbiotic V/Astec (0,46x25cm x 5 µm) da Sigma Aldrich®) a ordem de eluição dos enantiômeros do carvedilol é (S)-(-) e (R)-(+) (NARDOTTO et al., 2016). O PI selecionado para as análises foi a lidocaína.

O cromatograma referente à análise do carvedilol está apresentado na Figura 5.

Figura 5. Cromatograma referente a análise da solução padrão dos enantiômeros do carvedilol (200 ng/mL) e PI (50 ng/mL). Condições cromatográficas: fase móvel composta por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min.



O modo de eluição polar orgânico é aquele em que não há água presente na composição da fase móvel, e devido os antibióticos macrocíclicos possuírem grupos altamente polares é possível utilizar fase móvel com 100% de solvente orgânico com a adição de modificadores orgânicos (ácido e base) para melhorar a seletividade. A fase polar orgânica deve ser vista como

primeira opção para separar enantiômeros que tenham mais de um grupo funcional em sua estrutura capaz de interagir com a fase estacionária (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

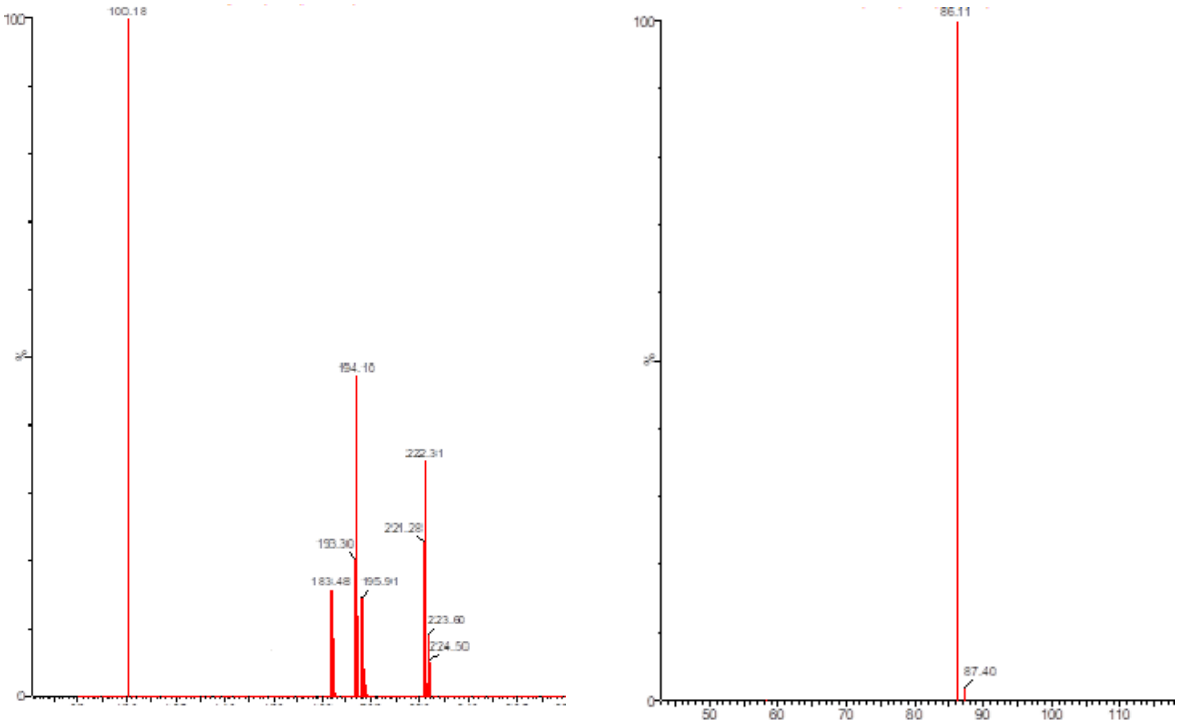
A proporção de 90:10 correspondente a metanol:etanol foi a que apresentou força cromatógrafica suficiente para separar os picos dos enantiômeros e manter uma boa resolução, além disso adicionou-se dietilamina e ácido acético para melhorar a seletividade. Quando os analitos possuem um grupo funcional básico, que é o caso do carvedilol, a dietilamina é regularmente adicionada à fase móvel para reduzir a assimetria dos picos, pois ela é capaz de interagir com os silanóis residuais da coluna quiral (BERNARDO, 2008).

As condições de monitoramento dos compostos de interesse no espectrômetro de massas foram avaliadas pela infusão direta do carvedilol e lidocaína no analisador de massas no modo positivo de ionização. A avaliação dos parâmetros de análise por MRM foi realizada para a obtenção dos íons produtos mais estáveis dos analitos e de maior abundância. Para isso a molécula protonada foi fragmentada na cela de colisão com gás argônio associado à energia de colisão específica para geração dos íons produtos. As transições de íons avaliadas para a quantificação (Q) e confirmação (C) dos analitos foram de m/z 407 → 100 e m/z 407 → 56 para o carvedilol e m/z 235 → 86 e m/z 235 → 58 para a lidocaína, respectivamente, m/z é a razão entre a massa e a carga dos íons.

A Figura 6 mostra os íons produtos de maior intensidade, extraídos do espectro MS/MS (razão m/z *versus* abundância relativa).

Figura 6. Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) carvedilol (200 ng/mL da mistura racêmica), B) lidocaína (1 µg/mL)

A) B)



Os parâmetros selecionados para a análise dos compostos por MS/MS estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros selecionados para análise do carvedilol e lidocaína por MS/MS

Parâmetros	Valores
Voltagem do capilar (V)	4000
Voltagem do cone (V)	Carvedilol 66
	Lidocaína 41
Energia de colisão (V)	Carvedilol (Q) 43 / Carvedilol (C) 83
	Lidocaína (Q) 23 / Lidocaína (C) 45
Temperatura (ºC)	600
Curtain gas (nitrogen)	10 psi
Nebulizer gas (air)	40 psi
Auxiliary gas (air)	40 psi

4.2. Otimização das condições de extração por SALLE dos enantiômeros do carvedilol em plasma

4.2.1. Seleção do solvente orgânico extrator e solução salina

A seleção do solvente orgânico e solução salina foi realizada pela combinação dos diferentes solventes e sais no procedimento da SALLE. Esta avaliação foi qualitativa e considerou-se a precipitação de proteína, a separação das fases e a presença de sal na fase orgânica, esta última pode ser observada através do precipitado resultante após a evaporação do solvente. A Tabela 8 apresenta as extrações realizadas e as respostas observadas.

Tabela 8. Combinação dos solventes e sais no procedimento da SALLE e as respostas qualitativas observadas

Solvente orgânico	Solução salina	Precipitação de proteínas	Separação da fase orgânica	Resíduo de sal na fase orgânica
ACN	Formiato de amônio	Sim	Boa separação	Pouco
	Acetato de amônio	Sim	Boa separação	Pouco ou ausente
THF	Formiato de amônio	Sim	Boa separação	Grande quantidade
	Acetato de amônio	Sim	Boa separação	Grande quantidade
ISOP	Formiato de amônio	Sim	Sem separação	-
	Acetato de amônio	Sim	Sem separação	-
Acetona	Formiato de amônio	Sim	Sem separação	-
	Acetato de amônio	Sim	Sem separação	-
MeOH	Formiato de amônio	Sim	Sem separação	-
	Acetato de amônio	Sim	Sem separação	-

Boa separação = formação de um sistema bifásico; Pouco ou ausente = pequena quantidade de resíduo na cor branco após evaporação do solvente; Grande quantidade = resíduo na cor branco em alta quantidade após a evaporação do solvente

Em todas as combinações ocorreu a precipitação de proteínas, como pode ser visto pela tabela. A fase orgânica foi separada da fase aquosa, formando um sistema bifásico, apenas quando foram utilizados os solventes ACN e THF, com ambos os sais. Independente do sal, nas extrações feitas com os solventes ISOP, acetona e MeOH não ocorreu a separação das fases, o que pode ser explicado pela forte interação que esses solventes tem com a água através de ligações de hidrogênio (TANG; WENG, 2013).

Quando a fase orgânica foi coletada e evaporada pode ser observada a precipitação dos sais. Isso ocorre devido à presença de uma pequena quantidade de água, e consequentemente presença de sal, na fase orgânica, mesmo após a formação do sistema bifásico. Ao se utilizar o solvente THF ocorreu grande precipitação dos sais formiato e acetato de amônio. Já utilizando a ACN como solvente extrator ocorreu a precipitação do sal formiato de amônio em pequena quantidade, porém maior e mais recorrente do que a precipitação do sal acetato de amônio. Isso corrobora com outros trabalhos (GRECCO et al., 2019; TANG; WENG, 2013) nos quais foi demonstrado que a ACN é um solvente que apresenta alta eficiência de extração e extratos limpos com baixo conteúdo de água na fase orgânica.

Dessa maneira, considerando todas as respostas qualitativas obtidas, e com o intuito de minimizar a injeção de sal no sistema cromatográfico, evitando entupimentos e danos, a ACN foi selecionada como solvente orgânico em conjunto com o sal acetato de amônio, obtendo um procedimento de extração SALLE com precipitação de proteínas, boa separação de fases e pouca ou nenhuma presença de sal na fase orgânica.

4.2.2 Otimização das condições de extração

O delineamento experimental é uma estratégia que vem sendo muito utilizada na área de química analítica para a otimização das técnicas de extração (BENEDETTI; CARRO; MAGI, 2018; FUSARI; RAMIREZ; CAMARGO, 2019; SEIRA et al., 2013; WANG; YIN; XU, 2013). As suas vantagens são a capacidade de analisar os efeitos das interações entre os fatores sobre a resposta com um menor número de experimentos, diminuindo o custo de análise (ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2013).

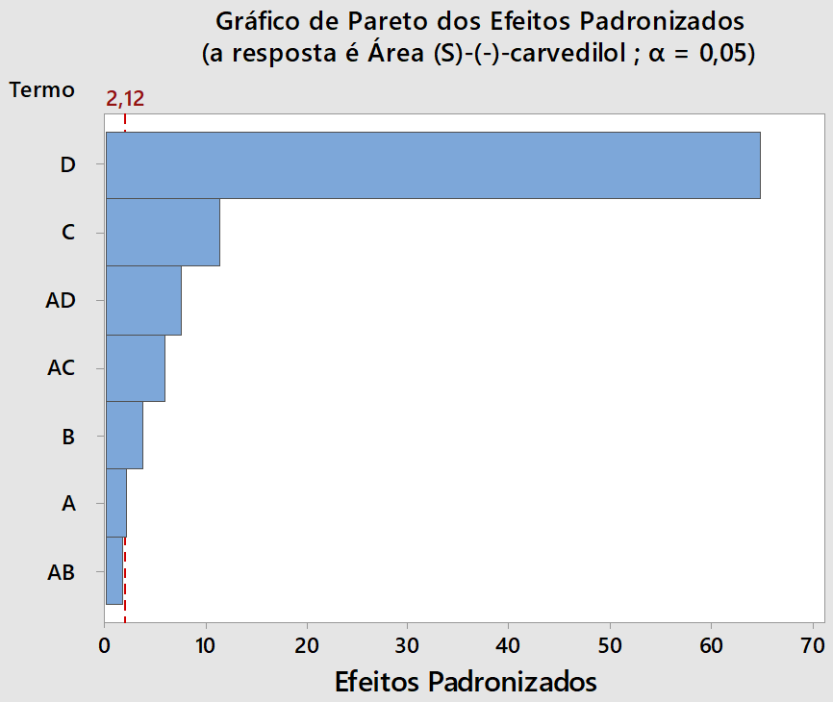
4.2.2.1 Planejamento fatorial fracionário

O delineamento fatorial completo (CFD, do inglês *complete factorial design*) e o delineamento fatorial fracionado (FFD, do inglês *fractional factorial design*) são exemplos de delineamento de primeira ordem (MONTGOMERY, 2013). O número de níveis e fatores determina o total de ensaios a serem realizados, porém o delineamento fatorial mais comum é aquele com 2 níveis e k fatores, 2^k = número de ensaios. É comum codificar os 2 níveis utilizando os sinais (+) para o nível alto e (-) para o nível baixo, os quais estão relacionados com valores reais dos fatores, permitindo ilustrar o delineamento sob forma de matrizes de planejamento (GALDÁMEZ, 2002; MACEDO, 2007). No FFD se tem 2^{k-p} ensaios, e se realiza apenas uma fração específica do completo (podendo ser ½ fração quando p=1 e ¼ fração quando p=2), sem comprometer as conclusões dos resultados (GALDÁMEZ, 2002).

Neste trabalho, na primeira etapa do delineamento foi realizado um FFD 2^{4-1} de resolução IV, com 4 fatores: A) volume de ACN, B) tempo de centrifugação, C) volume de solução de acetato de amônio D) concentração da solução de acetato de amônio, como descrito no item 3.9.2. Os gráficos de Pareto dos efeitos dos fatores estudados sobre a área dos enantiômeros do carvedilol foram semelhantes para ambos os enantiômeros, por isso optou-se por apresentar apenas o gráfico de Pareto para o (S)-(-)-carvedilol (Figura 7).

Nesse gráfico as barras horizontais possuem comprimento proporcional aos valores absolutos dos efeitos e a linha vertical vermelha delimita um valor de *t* crítico (2,02) para um nível de confiança de 95% (p=0,05). Assim todos os efeitos cuja barra ultrapassa a linha vertical ($t > 2,02$) são aqueles estatisticamente significativos.

Figura 7. Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do (S)-(-)-carvedilol utilizando a SALLE. A linha vertical define o nível de confiança de 95%. Elaborado pelo autor utilizando o programa Minitab ®



Ambos os gráficos dos dois enantiômeros possuem o mesmo perfil de resposta devido as áreas dos enantiômeros serem semelhantes pois esses possuem propriedades físico-químicas idênticas e se encontram em uma mistura racêmica. Todos os fatores exerceram efeito significativo sobre as áreas, sendo a concentração da solução salina a de maior influência (maior valor número de *t*).

Os fatores volume de ACN, volume de solução de acetato de amônio e concentração da solução de acetato de amônio possuem efeitos com valores positivos, o que significa que as áreas aumentam quando se utiliza um maior valor (nível alto) desses fatores. O tempo de centrifugação foi o único fator com efeito negativo, de modo que o aumento do tempo de centrifugação causa a diminuição das áreas.

A concentração da solução de acetato de amônio foi o fator mais significativo. Isso pode ser explicado porque a concentração dos íons advindos do sal é responsável por dois acontecimentos: a redução da miscibilidade entre a fase orgânica e a fase aquosa, formando o sistema bifásico, e por reduzir a solubilidade dos analitos orgânicos não carregados na fase

aquosa, sendo extraídos para a fase orgânica (JAIN et al., 2014; RICE; IRVING; LEONARD, 1993). O efeito positivo desse fator vai ao encontro com os trabalhos existentes na literatura (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013; XIONG et al., 2015), pois a maior parte deles utiliza concentrações de solução salina elevadas, próximas da saturação.

O volume de solução de acetato de amônio também teve efeito positivo, pois aumentando o volume aumenta-se a quantidade final dos íons advindos do sal, e como já dito anteriormente, isso facilita a formação do sistema bifásico e a extração do carvedilol para a fase orgânica. Também foi observado um efeito positivo no volume de ACN, e mesmo sendo pouco significativo, o aumento no volume leva a uma melhor separação das fases aquosa e orgânica e resulta em um maior volume de fase orgânica, facilitando a posterior coleta da mesma (ALSHISHANI; SALHIMI; SAAD, 2018). O efeito negativo do tempo de centrifugação pode estar relacionado à uma satisfatória separação de fases já ter sido obtida no nível baixo utilizado.

Dessa maneira os fatores volume de solução de acetato de amônio, volume de ACN e tempo de centrifugação foram incluídos no CCD para a seleção da condição ótima de extração dos enantiômeros do carvedilol por SALLE. Já o fator concentração da solução de acetato de amônio foi mantida no nível alto (5 mol/L) para a realização do CCD, pois essa concentração já está próxima da concentração de saturação.

4.2.3. Seleção da condição ótima de extração

O CCD é um exemplo de delineamento de segunda ordem, e é capaz de gerar modelos quadráticos completos. Ele é formado por um delineamento fatorial 2^f (podendo ser completo ou fracionado), adicionado de pontos estrela e pelo menos um ponto central (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011). Os pontos estrela estão localizados em $+\alpha$ e $-\alpha$ com relação ao centro, e α pode ser calculado por $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ (NOVAES et al., 2017). Assim, todos os fatores são estudados em cinco níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) (BEZERRA et al., 2008). O número total de experimentos é $N=k^2 + 2k + pc$, onde pc é o número de experimentos no ponto central (NOVAES et al., 2017).

Dessa maneira, após a identificação dos fatores que influenciam na eficiência da SALLE, foi realizado um CCD 2^3, como descrito no item 3.9.3. Os coeficientes dos modelos gerados para ambos os enantiômeros do carvedilol são semelhantes, bem como os resultados

da análise de variância, por isso estão apresentados apenas os resultados do (S)-(-)-carvedilol nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Coeficientes do modelo de superfície de resposta para o (S)-(-)-carvedilol

Efeitos	Coeficientes da área do (S)-(-)-carvedilol
x1= volume de ACN	-1680,53
x2= tempo de centrifugação	732,52
x3= volume de solução de acetato de amônio 5 mol/L	770,59
x1x2= interação de segunda ordem dos fatores x1 e x2	1673,58
x2x3= interação de segunda ordem dos fatores x2 e x3	932,58

Os efeitos e a interação que não tiveram efeito significativo sobre a área do (S)-(-)-carvedilol com um nível de confiança de 95% (p=0,05) não foram representados.

Tabela 10. Tabela ANOVA do modelo de superfície de resposta para o (S)-(-)-carvedilol

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado
Regressão	5	249973125	49994625	12,75315625	2,42208547
Resíduos da regressão	45	176407948	3920176,62		
Falta de ajuste	9	5,59E+07	6209926,11	1,854961109	2,15260747
Erro puro	36	1,21E+08	3347739,25		
Total	50	4,26E+08			

Os efeitos quadráticos de todos os fatores e a interação de segunda ordem dos fatores x1 e x3 não exerceram efeito sobre a área dos enantiômeros (Tabela 8), com nível de confiança de 95% (p=0,05).

Como pode ser observado na tabela 10, o modelo apresentou valor de F_{calc} igual a 12,75, o qual é superior ao valor de $F_{tab\ (5;45;0,05)}$= 2,42, sendo um modelo significativo. O valor de F para a falta de ajuste foi de 1,85, o qual é inferior ao valor de $F_{tab(9;36;0,05)}$ =2,15, sendo um modelo preditivo, assim ele pode ser utilizado para predizer a resposta por meio da equação

área (S)-(-)-carvedilol = 30550,31 -1680,53.x_1 +732,52.x_2 + 770,59.x_3 + 1673,58.x_1.x_2 +932,58.x_2.x_3 , na qual x_1 corresponde ao volume de ACN, x_2 ao tempo de centrifugação e x_3 ao volume de solução de acetato de amônio 5 mol/L. A equação polinomial do modelo apresentou coeficiente de determinação ajustado R^2 = 0,586. Este valor baixo pode ser explicado pelo desvio dos valores nas triplicatas feitas de cada experimento gerado no CCD. Porém independente disso o modelo é significativo e preditivo, sendo assim é possível utilizá-lo para a predição das respostas. Nas Figuras 8 e 9 estão ilustrados os gráficos de superfície de resposta obtidos para a área do (S)-(-)-carvedilol, e novamente são gráficos semelhantes àqueles obtidos para a área do (R)-(+)-carvedilol e pos esta razão está sendo apresentado o gráfico apenas para o (S)-(-)-carvedilol.

A partir dos resultados obtidos com o CCD pode-se obter a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface methodology*), na qual o sistema estudado é descrito por funções polinomiais lineares ou quadráticas, a partir das quais são gerados gráficos onde se pode explorar as condições experimentais até a sua otimização, ou seja, encontrar os valores ótimos para cada fator (BEZERRA et al., 2008).

Figura 8. Gráfico de superfície de resposta da influência do tempo de centrifugação e do volume de ACN avaliados no CCD *versus* área do (S)-(-)-carvedilol. Elaborado pelo autor utilizando o programa Statistica ®

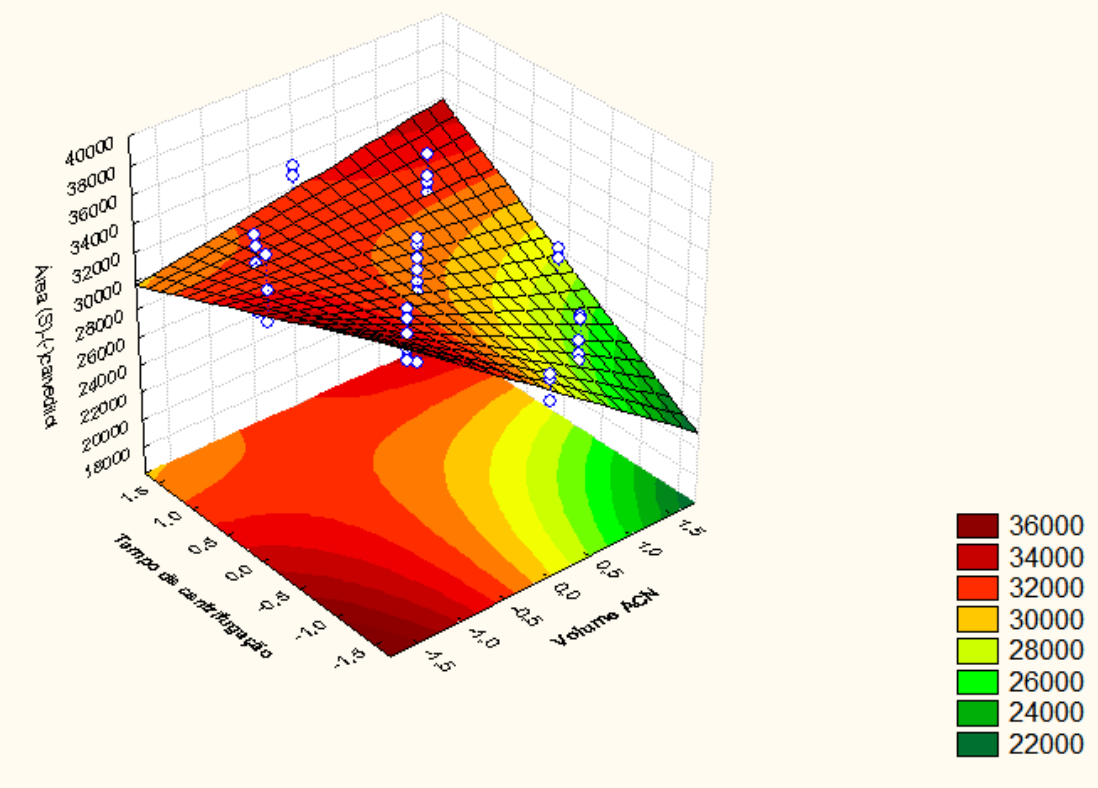
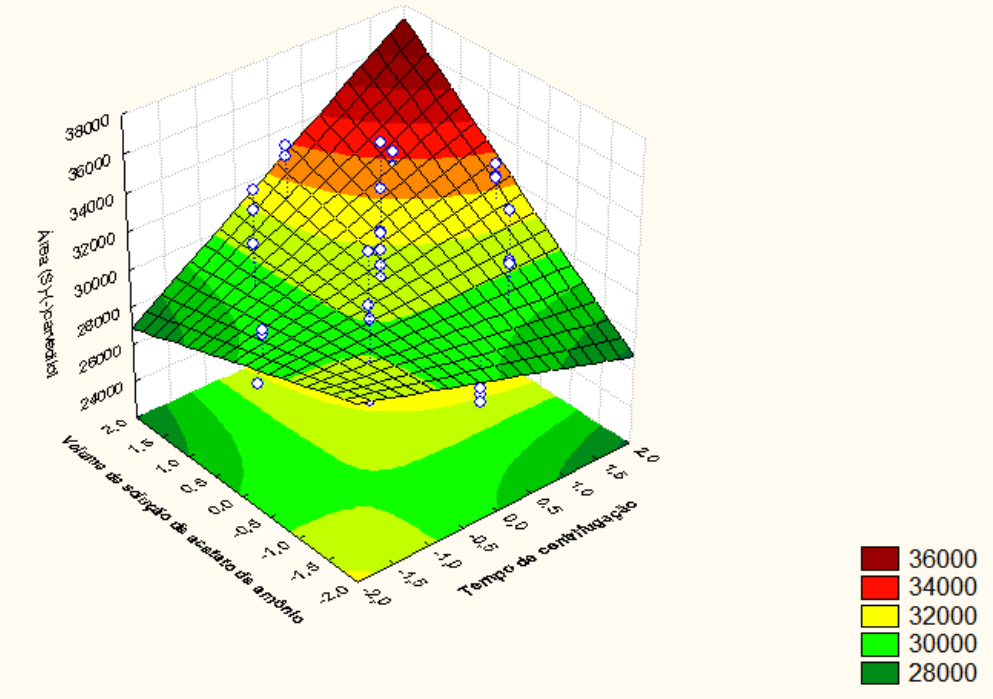


Figura 9. Gráfico de superfície de resposta da influência do tempo de centrifugação e do volume de solução de acetato de amônio avaliados no CCD *versus* área do (S)-(-)-carvedilol. Elaborado pelo autor utilizando o programa Statistica ®

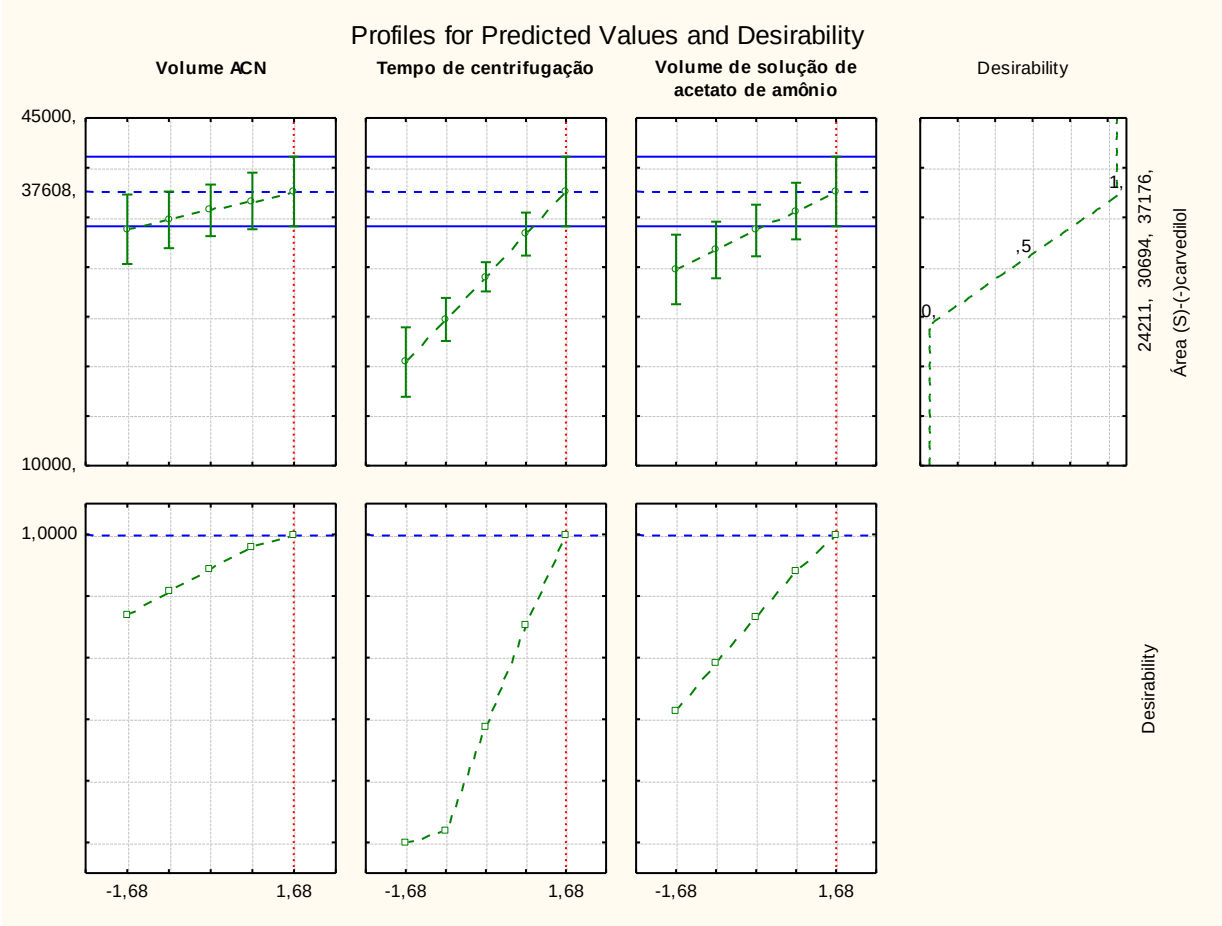


Com os resultados obtidos do CCD, pode-se realizar também o teste de desejabilidade. Nele, os valores obtidos nas superfícies de resposta são transformados em uma escala adimensional a qual varia de d=0, para uma resposta completamente indesejável e d=1 para uma resposta totalmente desejada. A desejabilidade total D é calculada através da média geométrica das desejabilidades individuais, e então um algoritmo é aplicado à função D para obter os valores de cada fator que a maximizam (FERREIRA et al., 2007).

O teste de desejabilidade foi realizado com o objetivo de definir as condições que maximizem a área dos enantiômeros do carvedilol, as condições ótimas da extração por SALLE foram definidas de acordo com a desejabilidade do (S)-(-)-carvedilol e (R)-carvedilol

A condição com os seguintes valores: 1268 µL de ACN, 10 minutos de centrifugação e 384 µL de solução de acetato de amônio 5 mol/L, foi a que apresentou D_{total}=1,0 , como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Gráfico de desejabilidade para a área do (S)-(-)-carvedilol



As condições otimizadas para o procedimento de extração dos enantiômeros do carvedilol por SALLE em amostras de plasma estão descritas na Tabela 11. Nesta condição houve uma recuperação para ambos enantiômeros do carvedilol de aproximadamente 93%.

Tabela 11. Condições da extração dos enantiômeros do carvedilol por SALLE em amostras de plasma

Condições otimizadas	
Volume de plasma	500 µL
Volume de carvedilol e PI	50 µL cada
Solvente orgânico e volume	ACN – 1268 µL
Solução salina	Solução de acetato de amônio
Concentração de solução salina e volume	5 mol/L – 384 µL
Tempo de centrifugação	10 minutos

4.3. Validação do método

4.3.1. Seletividade

A análise de 6 amostras de fontes distintas de plasma branco (4 normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada) demonstrou que o método é seletivo pois não há nenhum sinal analítico interferente no tempo de retenção do carvedilol e do PI, quando os cromatogramas de plasma branco foram comparados com o cromatograma obtido para o LIQ.

Os cromatogramas referentes aos resultados obtidos para as amostras do branco de plasma e do LIQ estão representados nas Figutas 11 e 12, respectivamente.

Figura 11- Cromatograma de plasma branco. Condições cromatográficas: fase móvel composta por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min.

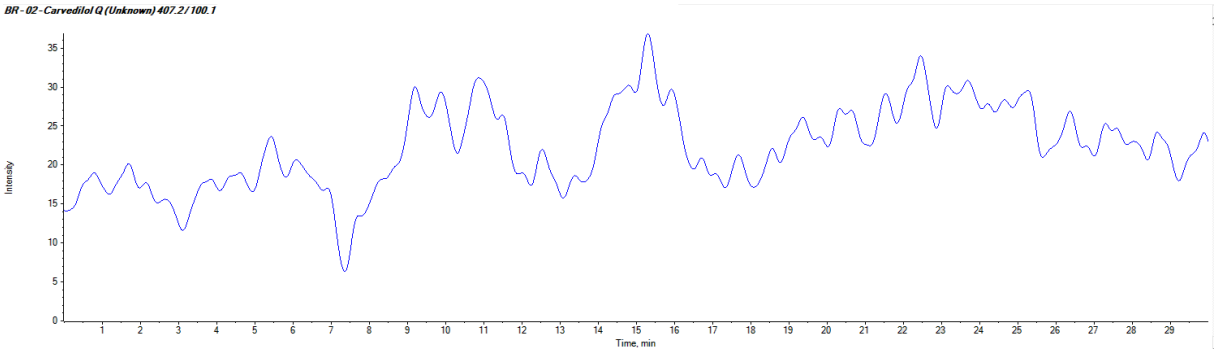
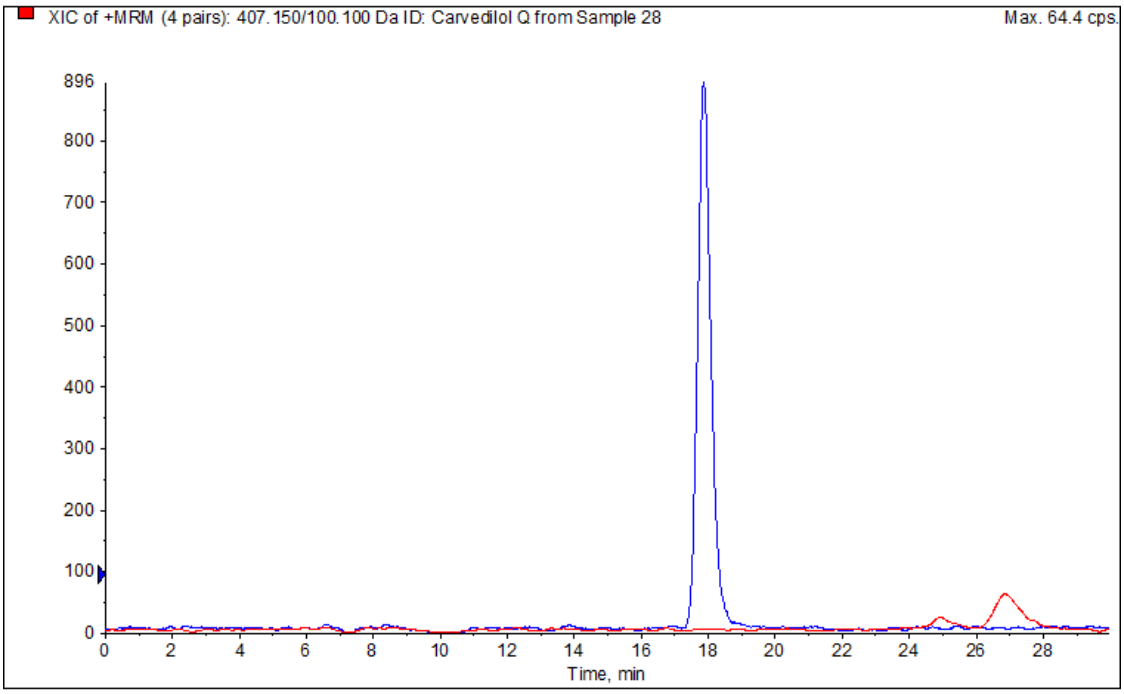
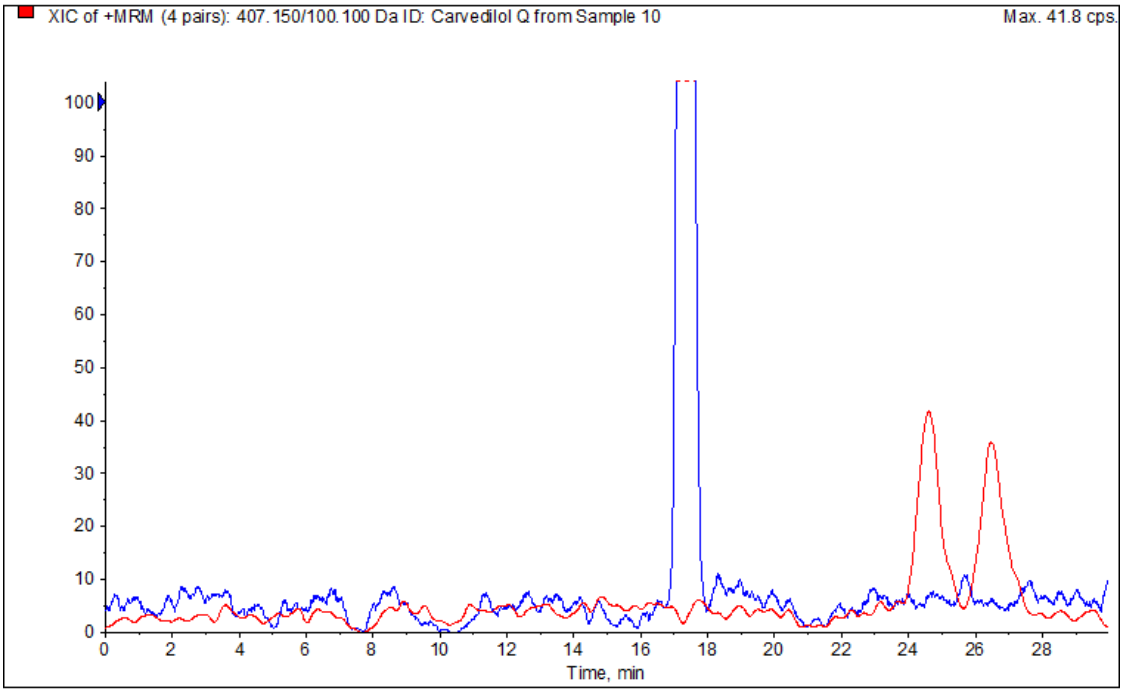


Figura 12- a) Cromatograma obtido para o LIQ **b)** Zoom do cromatograma. Condições cromatográficas: fase móvel composto por metanol:etanol (90:10, v/v), 0,02% de dietilamina e 0,18% de ácido acético, temperatura de 21ºC e vazão 0,6 mL/min.



a)



b)

4.3.2. Efeito residual

As duas amostras do branco de plasma analisadas após a injeção de uma amostra processada na concentração do LSQ não apresentaram interferentes em tempo próximo ao dos enantiômeros do carvedilol e PI, mostrando que não há efeito residual de injeções anteriores.

4.3.3. Efeito matriz

É de extrema importância a avaliação do efeito matriz durante a validação de um método bioanalítico, em especial nos métodos que utilizam o espectrômetro de massas, o qual apresenta alta seletividade e especificidade estando assim mais propenso a interferências, uma vez que substâncias presentes na matriz podem coeluir e afetar a eficiência de ionização dos analitos e consequentemente a detecção dos mesmos (CASSIANO et al., 2009a).

Através dos ensaios realizados para avaliar o efeito matriz, os valores de FMNs para ambos os enantiômeros do carvedilol e PI foram calculados e apresentaram-se inferiores a 15% (Tabela 12). Sendo assim, o método não apresentou efeito matriz capaz de interferir na resposta do analito ou PI.

Tabela 12. Efeito matriz para o (S)-carvedilol, (R)-carvedilol e PI

Analito	Concentração	FMN	CV (%)[b]
(S)-carvedilol	CQB	1,0	2,8
(S)-carvedilol	CBA	1,0	3,4
(R)-carvedilol	CQB	1,0	2,9
(R)-carvedilol	CQA	1,0	3,5
PI	-	1,0	5,2

[b] Coeficiente de variação, expresso como porcentagem

4.3.4. Curva de Calibração

As curvas de calibração foram analisadas de modo a detectar a menor concentração possível de carvedilol na matriz e abrangendo a faixa de concentração que contemple as concentrações esperadas do carvedilol nos pacientes. A faixa de concentração plasmática para os enantiômeros do carvedilol é de 1-50 ng/mL (Tabela 1) na dose de 25 mg. Assim, foi determinada uma faixa de concentração plasmática de 0,5-100 ng/mL.

A curva de calibração analítica foi construída, em triplicata, nas concentrações 0,5; 1,0; 5,0; 50; 80; 100 ng/mL de carvedilol, plotando-se as concentrações conhecidas do analito *versus* a razão da área do carvedilol e PI. A análise dos dados foi feita pelo modelo de regressão ponderada (peso = 1/x) e os resultados para ambos os enantiômeros do carvedilol estão apresentados na Tabela 13, que mostram que o modelo de regressão está bem ajustado.

Tabela 13. Parâmetros da curva de calibração do método para análise do (S)-carvedilol

Enantiômero	**Faixa linear (ng/mL)**	**Equação linear**	**r[a]**	**ANOVA *Lack of fit***	
				***F*[b]**	***p***
(S)-carvedilol	0,5 – 100	y= 0,009367x+ 0,001619	0,9993	2,63	0,084
(R)-carvedilol	0,5 – 100	y= 0,009403x+ 0,001972	0,9975	2,07	0,146

[a] r = coeficiente de correlação

[b] F tabelado$_{(0,05;4;12)}$= 3,26

Se o valor de $F \leq F_{crítico}$ (tabelado) aceita-se a linearidade, ou seja, o modelo foi considerado satisfatório (CASSIANO et al., 2009a).

4.3.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas pelo CV (%) e EPR (%), respectivamente, pela análise em quintuplicata dos enantiômeros do carvedilol em 5 níveis de concentrações (CQLIQ, CQB, CQM, CQA, CDQ) em uma mesma corrida analítica (intracorrida) e em três corridas distintas em dias diferentes (intercorridas). Os resultados para ambos os enantiômeros do carvedilol estão apresentados na tabela 14. Todos os valores estão dentro do que é recomendado pela ANVISA (abaixo de 20% para o LIQ e abaixo de 15% para CQB, CQM, CQA e CQD).

Tabela 14. Precisão e exatidão intercorridas e intracorridas para a análise do (S)-carvedilol e (R)-carvedilol

Enantiômero		Controle	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
(S)-carvedilol	**Intracorrida**	CQLIQ	4,26	7,79
		CQB	6,75	-0,53
		CQM	6,91	4,12
		CQA	2,59	0,19
		CQD	3,55	-7,51
	Intercorrida	CQLIQ	7,31	10,3
		CQB	7,17	-1,54
		CQM	7,47	0,95
		CQA	7,21	3,87
		CQD	7,06	-8,62
(R)-carvedilol	**Intracorrida**	CQLIQ	4,90	-1,71
		CQB	7,51	-2,25
		CQM	8,12	7,98
		CQA	5,73	-0,16
		CQD	4,54	-7,87
	Intercorrida	CQLIQ	7,92	5,33
		CQB	9,74	-4,26
		CQM	9,39	3,12
		CQA	5,60	2,90
		CQD	7,90	-8,50

4.3.6. Estabilidade

Amostras do branco de plasma fortificadas nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA, em triplicata, foram submetidas aos testes de estabilidade de congelamento e descongelamento (3 ciclos), curta duração (5 horas), pós processamento (35 horas) e longa

duração (60 dias). Para a quantificação das amostras foi utilizada uma curva de calibração com amostras processadas recém preparadas. Os resultados para ambos os enantiômeros do carvedilol estão apresentados na tabela 15. Os valores de precisão e exatidão estão conforme o que é recomendado pela ANVISA (abaixo 15%), demonstrando a estabilidade dos enantiômeros do carvedilol nas condições de armazenamento, preparo e análise.

Tabela 15. Estabilidade para a análise do (S)-carvedilol e (R)-carvedilol

Enantiômero	Estabilidade	Controle	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
(S)-carvedilol	Congelamento e descongelamento	CQB	4,90	0,796
		CQA	4,15	4,88
	Curta duração	CQB	2,95	-5,12
		CQA	3,19	7,32
	Pós processamento	CQB	5,57	-4,77
		CQA	5,27	-5,87
	Longa duração	CQB	9,69	-13,27
		CQA	3,73	3,69
(R)-carvedilol	Congelamento e descongelamento	CQB	3,11	-3,06
		CQA	1,08	4,03
	Curta duração	CQB	3,19	-6,85
		CQA	2,01	6,76
	Pós processamento	CQB	7,40	-4,59
		CQA	9,47	-6,01
	Longa duração	CQB	11,58	-14,95
		CQA	4,83	3,31

A estabilidade dos enantiômeros carvedilol em solução (em metanol) foi avaliada em triplicata utilizando-se amostras da solução de trabalho de menor concentração resultando na concentração do CQLIQ e amostras da solução de trabalho de maior concentração (solução estoque) resultando na concentração do LSQ, comparando-se soluções recém preparadas e

soluções preparadas e armazenadas durante 3 semanas. A estabilidade do PI em solução (em metanol) foi avaliada de maneira semelhante à do carvedilol, nas concentrações de 5 e 10 ng/mL. Como demonstrado na Tabela 16, as soluções de carvedilol e PI permaneceram estáveis, com desvio inferior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas, como recomendado pela ANVISA.

Tabela 16. Estabilidade dos enantiômeros do carvedilol e do PI em solução

Analito	Concentração	Desvio (%)[a]
(S)- carvedilol	CQLIQ	-1,64
	LSQ	-1,14
(R)- carvedilol	CQLIQ	-1,36
	LSQ	-1,51
PI	5 ng/mL	1,11
	10 ng/mL	1,25

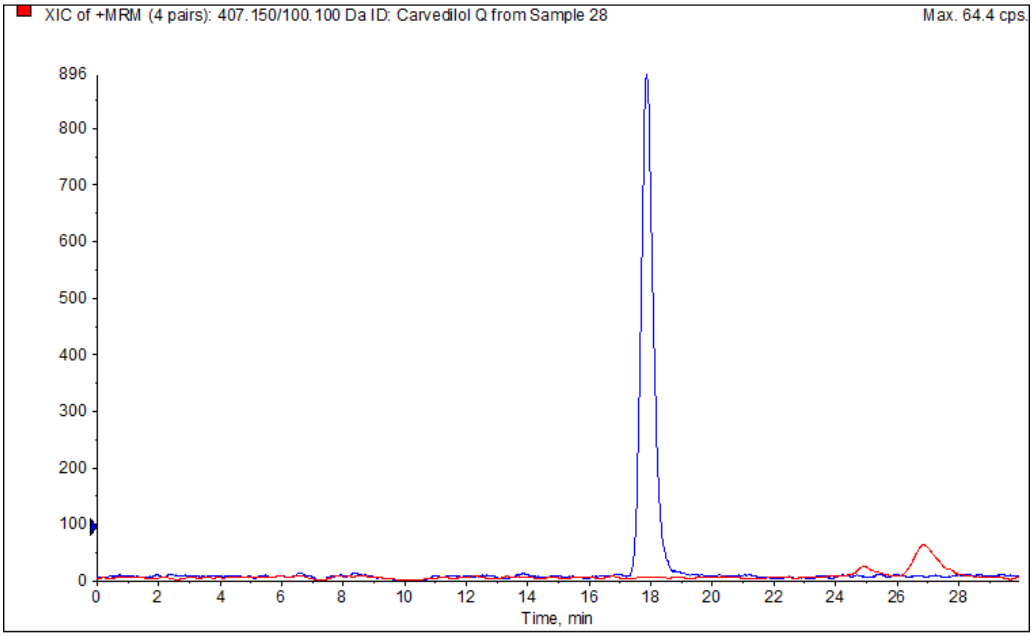
[a] Desvio = ((média das áreas da solução preparada há 3 semanas – média das áreas da solução recém preparada) / média das áreas da solução recém preparada) *100

Em relação à avaliação da racemização, em estudo descrito na literatura semelhante ao realizado neste trabalho (POGGI et al., 2012), não foi observada a racemização do carvedilol durante todo o procedimento analítico, da extração até a análise cromatográfica.

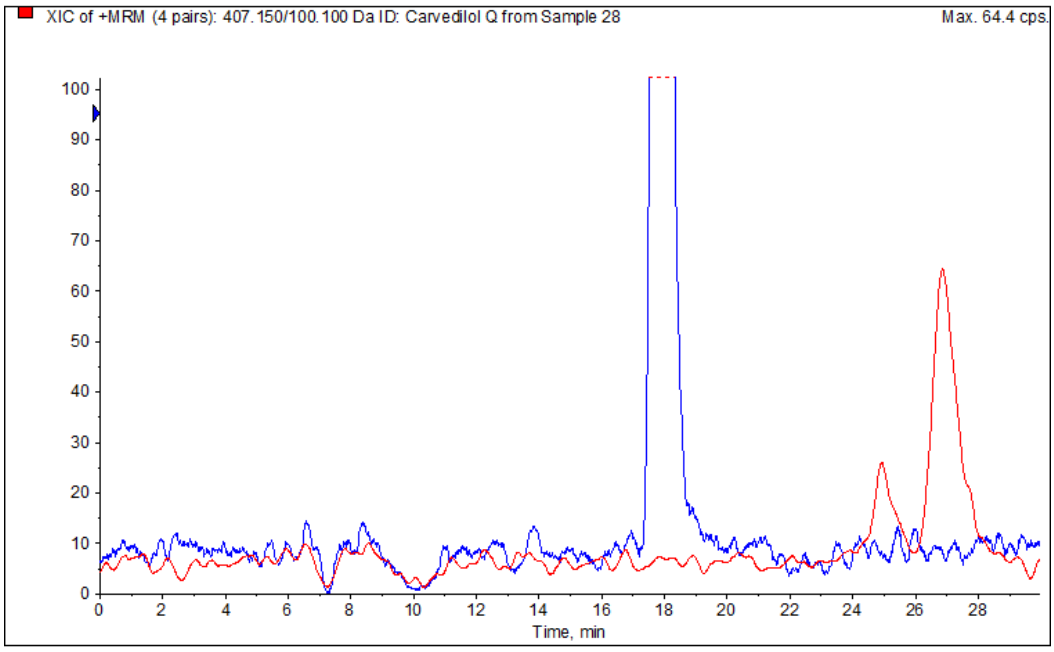
4.4. Aplicação do método

Amostras de plasma de pacientes do HCFMRP/USP coletadas antes e após a realização da cirurgia bariátrica foram analisadas para demonstrar a aplicabilidade do método, no qual foi possível quantificar os enantiômeros do carvedilol. O cromatograma referente a análise da amostra de plasma de um paciente coletada 1h após a administração de 25mg de carvedilol está demonstrado na Figura 13. O valor de concentração dos enantiômeros ficou dentro da faixa determinada (0,5-100 ng/mL), sendo 13,0 ng/mL para o (S)-carvedilol e 26,6 ng/mL para o (R)-carvedilol, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho e demonstra que o método pode ser utilizado em estudos farmacocinéticos.

Figura 13 – **a)** Cromatograma referente a uma amostra de plasma de um paciente coletada 1h após a administração de 25 mg de carvedilol **b)** Zoom do cromatograma



a)



b)

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo apresentam o primeiro método otimizado pelo delineamento experimental usando a SALLE para análise dos enantiômeros do carvedilol em plasma humano e aplicação em amostras de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Esta técnica de extração apresenta a vantagem de ser simples e de fácil execução quando comparada às outras técnicas utilizadas até o momento para esta finalidade, além de apresentar uma boa recuperação e concentrar a amostra. Quando comparada à precipitação de proteínas, a SALLE é mais seletiva uma vez que também apresenta característica da extração líquido-líquido. Entretanto, é mais vantajosa do que esta última por usar menor volume de solvente orgânico e menos tóxico, ser simples e rápida e não há possibilidade de formação de emulsão, podendo ser utilizada numa rotina de laboratório. Além disso, foi possível obter a separação dos enantiômeros do carvedilol e de seus metabólitos com uma resolução de aproximadamente 1,5 entre os enantiômeros utilizando-se a coluna Chirobiotic V/Astec em um tempo de análise de 30 min. Os parâmetros do espectrômetro de massas selecionados resultaram em íons produtos estáveis e abundantes do carvedilol e PI. Além disso, o uso do delineamento experimental para a otimização dos parâmetros que influenciam na SALLE possibilitou um estudo mais extenso da influência das variáveis e dos efeitos das interações entre essas variáveis no processo de extração. O método desenvolvido foi então validado e apresentou seletividade, linearidade na faixa de concentração de 0,5 a 100 ng/mL para cada enantiômero do carvedilol, precisão e exatidão. Não foi observado efeito residual e efeito matriz, e os enantiômeros do carvedilol apresentaram estabilidade em plasma após submetidos a diferentes condições de armazenamento, preparo e análise. Amostra de plasma de um paciente que foi submetido à cirurgia bariátrica coletada 1h após a administração de 25mg de carvedilol foi analisada e os enantiômeros do carvedilol foram quantificados com sucesso, concluindo assim que o método proposto atingiu o objetivo inicial. O método também poderá ser utilizado em estudos farmacocinéticos posteriores para comparar as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol em grupos de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e grupos controle. Além disso, este método poderá ser utilizado na rotina laboratorial para quantificação dos enantiômeros do carvedilol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Macrocyclic Antibiotics as Effective Chiral Selectors for Enantiomeric Resolution by Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 52, n. 11, p. 679–691, 2000.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. **IL Farmaco**, v. 57, p. 513–529, 2002.

ADMINISTRATION, F. AND D. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. PRESCRIBING INFORMATION: COREG (Carvedilol). p. 3–21, 2016.

ALSHISHANI, A.; SALHIMI, S. M.; SAAD, B. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, n. December 2017, p. 51–59, 2018.

ANNY, A. et al. Efficient molecularly imprinted polymer as a pipette-tip solid-phase sorbent for determination of carvedilol enantiomers in human urine. **Journal of Chromatography B**, 2017.

ANVISA. RDC Nº 27. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 75, p. 1–10, 2012.

ARMSTRONG, D. W. et al. Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 1473–1484, 1994.

BACHMAKOV, I. et al. Characterization of β-adrenoceptor antagonists as substrates and inhibitors of the drug transporter P-glycoprotein. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 273–282, 2006.

BEHN, F. et al. Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. **Journal of Chromatography B**, v. 755, p. 111–117, 2001.

BENEDETTI, B.; CARRO, M. DI; MAGI, E. Multivariate optimization of an extraction procedure based on magnetic molecular imprinted polymer for the determination of polycyclic hydrocarbons in sea water. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 1199–1206, 2018.

BERNARDO, N. P. **Análise estereosseletiva do cloridrato de cis- tramadol e de suas impurezas em matéria-prima e formulação farmacêutica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

BERTHOD, A. Chiral Recognition Mechanisms. **Analytical Chemistry**, p. 2093–2099, 2006.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in

analytical chemistry. **Elsevier**, v. 76, p. 965–977, 2008.

BORDALO, L. A. et al. Cirurgia bariátrica: como e por que suplementar. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 113–120, 2011.

BORTOLOTTO, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Rev Bras Hipertens**, v. 16, n. 4, p. 215–220, 2009.

CASSIANO, N. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISES DE PEQUENAS MOLÉCULAS EM MATRIZES BIOLÓGICAS. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009a.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009b.

DALGLIESH, C. E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 756, n. 0, p. 3916–3922, 1952.

EMA. Guideline on bioanalytical method validation. **EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use**, v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2012.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design : An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FURLONG, M. T. et al. A validated enantioselective LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of carvedilol and its pharmacologically active 4’-hydroxyphenyl metabolite in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 574–579, 2012.

FUSARI, C. M.; RAMIREZ, D. A.; CAMARGO, A. B. Simplified analytical methodology for glucosinolate hydrolysis products : a miniaturized extraction technique and multivariate optimization. **Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 309–316, 2019.

GALDÁMEZ, E. V. C. **APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PLANEJAMENTO E ANÁLISE DE EXPERIMENTOS NA MELHORIA DA QUALIDADE DE UM PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTOS PLÁSTICOS**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2002.

GARRISON, K. L.; SAHIN, S.; BENET, L. Z. Few Drugs Display Flip-Flop Pharmacokinetics and These Are Primarily Associated with Classes 3 and 4 of the BDDCS. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3229–3235, 2015.

GEHR, T. W. B. et al. The pharmacokinetics of carvedilol and its metabolites after single and multiple dose oral administration in patients with hypertension and renal insufficiency.

European Journal of Clinical Pharmacology, v. 55, p. 269–277, 1999.

GLAXOSMITHKLINE. PRESCRIBING INFORMATION: Carvedilol Phosphate Extended-release Capsules. 2011.

GORDON, P. C.; KAIO, G. H.; SALLET, P. C. Aspectos do acompanhamento psiquiátrico de pacientes obesos sob tratamento bariátrico: Revisão. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 38, n. 4, p. 148–154, 2011.

GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, n. 2, p. 99–110, 2019.

HAMIDI, S.; SOLTANI, S.; JOUYBAN, A. A dispersive liquid – liquid microextraction and chiral separation of carvedilol in human plasma using capillary electrophoresis. **Future Science**, v. 7, n. Bioanalysis, p. 1107–1117, 2015.

HONDA, M. et al. Effect of CYP2D6 * 10 on the Pharmacokinetics of R - and S -Carvedilol in Healthy Japanese Volunteers. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1476–1479, 2005.

JAIN, D. et al. Double- Salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of Temozolomide from biological samples. **Journal of Chromatography B**, p. 86–94, 2014.

JIANG, J. et al. Enantioselective and sensitive determination of carvedilol in human plasma using chiral stationary-phase column and reverse-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 960, p. 92–97, 2014.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid – liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 113–119, 2011.

LOFTSSON, T. et al. Carvedilol: Solubilization and Cyclodextrin Complexation: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 2, p. 425–430, 2008.

LOURENÇO, T. D. C. et al. FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155–2164, 2010.

MACEDO, R. M. P. R. DE. **Aplicação da metodologia de planejamento de experimentos para formulação de massas cerâmicas para telhas**. [s.l.] Universidade Federal do Rio

Grande do Norte, 2007.

MAGIERA, S.; ADOLF, W.; BARANOWSKA, I. Simultaneous chiral separation and determination of carvedilol and 5 ’ -hydroxyphenyl carvedilol enantiomers from human urine by high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. **Cent. Eur. J. Chem.**, v. 11, n. 12, p. 2076–2087, 2013.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-Out of Acetone from Water- Basis of a New Solvent Extraction System. **Anal. Chem.**, v. 45, n. 11, p. 1915–1921, 1973.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8. ed. [s.l.] Wiley, 2013.

MORGAN, T. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Carvedilol. **Clinical Pharmocokinetics**, v. 26, n. 5, p. 335–346, 1994.

NARDOTTO, G. H. B. et al. Chiral analysis of carvedilol and its metabolites hydroxyphenyl carvedilol and O-desmethyl carvedilol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, p. 173–180, 2016.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I : Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

OLDHAM, H. G.; CLARKE, S. E. in Vitro Identification of the Human Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of R (⁒) - and S (⁒) -Carvedilol Abstract : **Drug metabolism and disposition.**, v. 25, n. 8, p. 970–977, 1997.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: a critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 290–307, 2013.

PACKER, M. et al. THE EFFECT OF CARVEDILOL ON MORBIDITY AND MORTALITY IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE. **Journal of Medicine**, v. 334, n. 21, 1996.

PECCININI, R. et al. Stereoselective Analysis of Carvedilol in Human Plasma and Urine using HPLC after Chiral Derivatization. **Biopharmaceutics & drug disposition**, 2008.

POGGI, J. et al. Analysis of Carvedilol Enantiomers in Human Plasma Using Chiral Stationary Phase Column and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **Chirality**, v. 24, p. 209–214, 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICE, N. M.; IRVING, H. M. N. H.; LEONARD, M. A. NOMENCLATURE FOR LIQUID-LIQUID DISTRIBUTION (SOLVENT EXTRACTION). **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 2373–2396, 1993.

SAITO, M. et al. Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 843, n. 1, p. 73–77, 2006.

SEIRA, J. et al. Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach for the determination of anticancer drugs in sludge by ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 27–38, 2013.

STANOJKOVIC, T. P. et al. Inhibition of proliferation on some neoplastic cell lines-act of carvedilol and captopril. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Reserach**, v. 24, n. 3, p. 387–395, 2005.

STOSCHITZKY, K. et al. Stereoselective Effects of (R) - and (S) -Carvedilol in Humans. **Chirality**, v. 346, n. January, p. 342–346, 2001.

TANG, Y. Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid – liquid extraction for bioanalysis. **Future Science**, v. 5, n. 12, p. 1583–1598, 2013.

TENERO, D. et al. Steady-State Pharmacokinetics of Carvedilol and Its Enantiomers in Patients with Congestive Heart Failure. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, p. 844–853, 2000.

VALENTE, I. M. A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de off-flavours em bebidas**. [s.l.] Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2014.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid – liquid extraction in acetonitrile / water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58–62, 2013.

WANG, Q.; YIN, C.; XU, L. Optimization of hydrophilic interaction LC by univariate and multivariate methods and its combination with salting-out liquid – liquid extraction for the determination of antihypertensive drugs in the environmental waters. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 6, p. 1007–1014, 2013.

WU, H. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid / liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1243–1248, 2008.

XIONG, X. et al. High-throughput salting-out assisted liquid – liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317–1324, 2015.

YANG, E. et al. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 609–615, 2004.

ZAKRZEWSKI JAKUBIAK, M. et al. Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 636–641, 2010.

ZARGHI, A. et al. Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: Application in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 250–253, 2007.

ZHOU, H.; WOOD, A. J. J. Stereoselective disposition of carvedilol is determined by CYP2D6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, p. 518–524, 1995.

ANEXOS

Anexo 1- Aprovação CEP

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara - UNESP

UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Impacto da cirurgia bariátrica de derivação gástrica em Y de Roux na farmacologia dos sistemas: estudo farmacocinético cruzado de dose única da simvastatina e carvedilol

Pesquisador: Natalia Valadares de Moraes

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 94756418.0.1001.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.242.503

Apresentação do Projeto:

O projeto aprovado previamente pelo CEP-FCFAr fazia menção a um estudo Multicêntrico; a emenda ora apresentada pela pesquisadora responsável pelo centro coordenador solicita a alteração de Multicêntrico para Unicêntricos, com instituições coparticipantes.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve alteração no objetivo da pesquisa previamente aprovada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve mudanças em relação aos riscos e benefícios aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A avaliação do projeto em referência foi realizada pelo CEP-FCFAr e devidamente aprovada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem alterações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a proposta da emenda não altera as características do projeto ou compromete sua execução; Considerando ainda que houve manifestação favorável pela instituição coparticipante e que a alteração ensejou a submissão do projeto ao CEP do HC-FMRP-USP para a

Anexo 2- Carta Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Araraquara, 18 de outubro de 2018.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP,

Declaro, a fim de viabilizar a execução da pesquisa intitulada ***"Análise enantiosseletiva do carvedilol e metabólitos em plasma humano por SPME/LC-MS/MS"***, sob a responsabilidade das pesquisadoras Profa. Dra. Cristiane Masseto Gaitani e Marcella Galatti Pavan que:

a) o projeto proposto pelas pesquisadoras será realizado em paralelo com o projeto "*Impacto da cirurgia bariátrica de derivação gástrica em Y de Roux na farmacologia dos sistemas: estudo farmacocinético cruzado de dose única da simvastatina e carvedilol*". Este último encontra-se em apreciação ética no sistema CEP/CONEP sob o CAAE 94756418.0.1001.5426 e tem como instituição proponente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, UNESP;

b) as pesquisadoras Profa. Dra. Cristiane Masseto Gaitani e Marcella Galatti Pavan fazem parte do projeto e estão autorizadas a utilizar as amostras dos pacientes para a determinação de carvedilol e seus metabóolitos por LC-MS/MS;

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Prof. Dr. Natália Valadares de Moraes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (FCF-UNESP)

Anexo 3- Carta plasma branco

DECLARAÇÃO

Conforme solicitação realizada pela **Profª. Dra. Cristiane Masetto de Gaitan** e pela aluna de Mestrado **Marcella Galatti Pavan** declaramos que o HEMAC - Serviço de Hemoterapia, reconhecendo a importância desempenhada pelas pesquisas no entendimento das patologias, seu diagnóstico e tratamento, está de acordo em ceder **CINCO UNIDADES DE PLASMA FRESCO CONGELADO** de seus estoques para a realização do projeto de pesquisa intitulado **"Análise enatiosseletiva do carvedilol e metabólicos em plasma humano por SPME/LC-MS/MS"**, desde que sejam cumpridas as determinações da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a pesquisa com seres humanos e que o referido projeto de pesquisa seja previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Todas as unidades cedidas foram testadas e apresentam todas as provas sorológicas negativas, estando liberadas para utilização conforme RDC vigente. Além disso, todas as bolsas contam com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos seus respectivos doadores. Esclarecemos que se tratam de unidades de plasma excedentes do uso clínico e, portanto, não haverá prejuízo aos estoques do Hospital São Francisco e ao atendimento hemoterápico dos pacientes assistidos por esta instituição.

Está doação se realiza **EXCLUSIVAMENTE** para fins acadêmicos, ficando expressamente proibido o uso total ou parcial deste material em seres humanos ou a sua comercialização. Além disso, fica acordado que o transporte, acondicionamento, o armazenamento e correto manuseio deste material é de responsabilidade **EXCLUSIVA** da beneficiada.

Finalmente, é de pleno conhecimento de ambas as partes que, por questões de limitações metodológicas, não é possível excluir a janela imunológica para as doenças testadas. Fica acordado que no caso de NOTIFICAÇÃO da Vigilância Sanitária devido a SOROCONVERSÃO a ENTIDADE RECEPTORA será comunicada.

Atenciosamente.

Ribeirão Preto, 15 de Agosto de 2018.

Dr. Geraldo Cunha
Hematologia
CRM 37.945

Dr. Geraldo Santana da Cunha Júnior
Coordenador Médico do Hemac – Serviço de Hemoterapia