

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

RICARDO MARTINS SILVA

**Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) em Plasma de Ratos Wistar:
Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico**

Recife

2011

RICARDO MARTINS SILVA

**Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) em Plasma de Ratos Wistar:
Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica

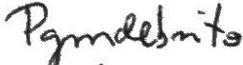
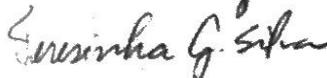
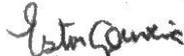
Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete de Souza Maia

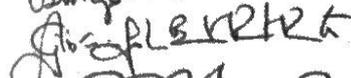
Recife

2011

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Ao trigésimo dia do mês de maio de dois mil e onze, às nove horas, na Sala de aulas 01 do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, realizou-se a Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada pelo Mestrando **Ricardo Martins Silva**, intitulada **“Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação quantitativa de um derivado tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) em plasma de ratos Wistar”**. A Banca Examinadora foi homologada, em vinte de maio de dois mil e onze, pela Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESQ, tendo como membros titulares as Professoras Doutoras: **Teresinha Gonçalves da Silva**, Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; **Glória Isolina Boente Pinto Duarte**, Doutora em Sciences Pharmaceutiques pela Universite de Grenoble I (Scientifique Et Medicale - Joseph Fourier), França; e **Ester Ribeiro Gouveia**, Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil; e como suplentes os Professores Doutores: **Maria Bernadete de Sousa Maia**, Doutora em Farmacologia pela Universite de Toulouse III (Paul Sabatier), França; e **Marçal de Queiroz Paulo**, Doutor em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. A Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva deu início à Sessão para a defesa da vigésima quarta Dissertação do Programa. Agradeceu a presença de todos e passou a palavra ao Mestrando, para fazer exposição de sua Dissertação, que efetuou em cinquenta minutos. Continuando, a Presidente solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (1ª examinadora), Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte (2ª examinadora) e Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia (3ª examinadora). Dando continuidade, a Presidente abordou a importância do trabalho desenvolvido pelo aluno e, em seguida, expressou seus agradecimentos, solicitando aos convidados a gentileza de se retirarem do recinto por alguns minutos, a fim de proceder a avaliação. A Comissão Examinadora atribuiu a **Ricardo Martins Silva** a seguinte menção: **“Aprovado”** por unanimidade, solicitando apenas que o título da dissertação seja alterado para: **“Determinação quantitativa de um derivado tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) no plasma de ratos Wistar: desenvolvimento e validação de método analítico”**. Face ao resultado, o mesmo está apto a receber o Título de Mestre em Inovação Terapêutica, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a Sessão foi encerrada e para constar, eu, Paulo Germano Moreira de Brito, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, lavrei, datei e assinei esta Ata, que também assinam os demais presentes. Recife, em 30 de maio de 2011.




DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, a minha sobrinha que está chegando ao mundo e a Lincoln.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu modo impressionante de me fazer entender a vida de um jeito tão peculiar, por me fazer passar por períodos de secas e de cheias para entender o quão tortuosos são os caminhos, mas o quão simples podem se tornar se quando uso minha energia para construir pontes no lugar de barreiras de contenção. Agradeço-o por tornar esse trabalho viável e por conseguir terminá-lo.

Agradeço eternamente aos meus pais, porque atuam na minha vida de uma maneira maravilhosa, porque sempre me escutaram, me apoiaram e me ajudaram a continuar em frente mesmo passando por percalços durante o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço tremendamente a oportunidade que a professora doutora Bernadete Maia me concedeu em fazer parte da sua equipe de pesquisa, acreditando que seríamos capazes de desenvolver uma nova linha de pesquisa no laboratório. Agradeço sua paciência, incentivo, conselhos e intervenções durante o decorrer da pesquisa.

Obrigado a todos os que conviveram comigo do laboratório durante esses dois anos, vividos mais intensamente no primeiro ano, Raphael, Rafaela, Ana Cássia e Eriwelton. Especialmente ao meu parceiro de pesquisa Raphael, que tantas manhãs e tardes quebrou a cabeça comigo na bancada e nos trabalhos das disciplinas, um amigo que vai ficar marcado.

Agradeço as minhas amigas de segundo grau que fizeram parte da minha vida de um modo mais presente no passado e me ensinaram tantas coisas, Rafa, Bella e Thaty. Agradeço ao apoio e ao ombro amigo da minha amiga Suellen, sempre especial, uma farmacêutica magnífica.

Quero especialmente agradecer a Lincoln, uma pessoa muito importante pra mim. Agradeço o seu infinito desejo de me ver bem e de me ver progredir, agradeço ao seu incentivo nesse trabalho e em outros projetos da minha vida. Obrigado pela segurança que me traz e por me ensinar a ver a vida com sua forma linda de uma forma mais fluida e real.

Torna-te quem tu és.
(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

SILVA, R. M. **Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-Bromo-Benzil)-5-(5-Bromo-2-Metoxi-Benzilideno)-Tiazolidina-2,4-Diona) em Plasma de Ratos.** 2011. 82f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Dentre vários compostos sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco, o derivado tiazolidínico (3-(2-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) (LPSF/GQ-113B) apresentou importante atividade antiinflamatória em ratos Wistar. Tal resultado despertou nosso interesse no desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para determinação do LPSF/GQ-113B em fluidos biológicos. Nesse contexto, um método bioanalítico sensível e seletivo foi desenvolvido e validado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação do LPSF/GQ-113B em plasma de ratos Wistar. O método envolveu precipitação das proteínas plasmática com acetonitrila e, o LPSF/GQ-113B foi separado utilizando uma fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila/água e ácido acético (85:14:1 v/v/v) eluída de forma isocrática através de uma coluna analítica Phenomenex® C₁₈ 5μ (150mm x 4.6mm) a uma temperatura de 40 °C. O comprimento de onda para a detecção foi de 254 nm. A curva de calibração foi linear na faixa de 500-16000 ng/ml/L, com coeficientes de determinação (r²) próximos da unidade (0.997-0.999). Os rendimentos de extração para as concentrações de 1500, 7500 e 13.000 ng/ml/L foram 94.2%, 92.2% e 97.3%, respectivamente. O limite de quantificação para o LPSF/GQ-113B foi de 500 ng/mL. A validação do método incluiu a análise dos parâmetros analíticos de exatidão e precisão intra-dia e inter-dia que se apresentaram dentro dos limites exigidos pela legislação pertinente. Dessa forma, o método proposto pode ser aplicado para determinação quantitativa do LPSF/GQ-113B em plasma de ratos Wistar em estudos farmacológicos, toxicológicos, farmacocinéticos e de biodisponibilidade.

Palavras-chave: Tiazolidinadionas. LPSF/GQ-113B. CLAE-UV. Validação bioanalítica.

ABSTRACT

SILVA, R. M. **Development and Validation of an Analytical Method for Quantitative Determination of a thiazolidine derivative (3 - (2-bromo-benzyl) -5 - (5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2 ,4-dione) in rats plasma.** 2011. 82f. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Among several compounds synthesized by the Laboratory of Planning and Synthesis of Drugs, from Federal University of Pernambuco, the thiazolidine derivative (3 - (2-bromo-benzyl) -5 - (5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-thiazolidine -2,4-dione) (LPSF/GQ-113B) showed significant antiinflammatory activity in rats. This result has stimulated our interest in the development and validation of a method for determining LPSF/GQ-113B in biological fluids. In this context a fast, sensitive, and selective detection has been developed and validated for quantifying LPSF/GQ-113B in rat plasma by high-performance liquid chromatography coupled UV detector method . A plasma protein precipitation method was used with acetonitrile and, LPSF/GQ-113B was separated using a mobile phase (acetonitrile/water/acetic acid (85:14:1 v/v/v)) on the analytical column Phenomenex ® C₁₈ 5µm (150mm x 4.6mm) stored into the oven at 40 °C temperature. The wavelength selected for detection was 254 nm. Over the range 500-16000 ng/mL, the calibration curve was linear with coefficient of determination (r^2) were close to unit (0.997564- 0.999765). The recoveries at concentrations of 500, 7500 and 13000 ng/mL were 94.2%, 92.2% and 97.3%. The lower limit of quantification obtained was 500 ng/mL. Validation of the method included analysis of the analytical parameters of accuracy and within-batch and between-batch were inside the limits required by the competent authorities. Thus, the proposed method can be applied for quantitative determination of LPSF/GQ-113B in plasma of Wistar rats in pharmacological studies, toxicological, pharmacokinetic and bioavailability.

Keywords: Thiazolidinediones. LPSF/GQ-113B. HPLC-UV. Bioanalytical validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação de uma separação.

Figura 2. Esquema da estrutura da sílica gel, mostrando os grupamentos químicos: silanol vicinal, silanol geminal e siloxano.

Figura 3. Etapas da extração em fase sólida.

Figura 4. Representação esquemática resumida da rota sintética do LPSF/GQ-113B.

Figura 5. Estrutura molecular do composto LPSF/GQ-113B, com seus dois anéis aromáticos destacados.

Figura 6. Regiões do UV compreendidas entre 229-279 nm, onde ocorre absorção máxima do LPSF/GQ-113B.

Figura 7. Espectrômetro de massas do composto LPSF/GQ-113B no modo negativo com aduto de uma molécula de acetonitrila.

Figura 8. Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,14min na fase móvel ACN:Água:Ac. Acético 85:14:1 v/v/v.

Figura 9. Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,89 min na fase móvel ACN:Água 85:15 v/v/v.

Figura 10. Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,65min na fase móvel ACN:Tampão fosfato de amônio 85:15 v/v/v.

Figura 11. Cromatograma obtido a partir de uma extração de solução plasmática de LPSF/GQ-113B a 7500 ng/mL,

Figura 12. Curva padrão obtida pela injeção de soluções extraídas de plasma contaminado nas concentrações de 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL.

Figura 13. Estrutura do composto LPSF/GQ-113B com átomos que possuem elétrons livres de natureza nucleofílica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado das análises de solubilidade do composto LPSF/GQ-113B.

Tabela 2. Variações dos tempos de retenção do analito LPSF/GQ-113B em função da variação do fluxo da fase móvel em 0.5, 0.8, 1.0 e 1.2 mL/min.

Tabela 3. Variações dos tempos de retenção do analito LPSF/GQ-113B em função da variação da temperatura do forno em 25, 30 e 40° C.

Tabela 4. Estabilidade das amostras de QC do LPSF/GQ113B em plasma de ratos Wistar sob diferentes condições de estocagem.

Tabela 5. Percentual de recuperação do analito LPSF/GQ-113B através do método da precipitação protéica, utilizado metanol e acetonitrila em duas proporções.

Tabela 6. Precisão e exatidão Intra-dia da curva padrão.

Tabela 7. Equação da reta, coeficiente de correlação e coeficiente de determinação da curva de calibração.

Tabela 8. Precisão e exatidão na quantificação do LPSF/GQ-113B em amostras de plasma de ratos Wistar.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA/MS	Agência nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde
RDC 886	Resolução da Diretoria Colegiada 886
FDA	Food and Drug Administration
EMEA	European Medicines Agency
GPIT	Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
CEEA	Comitê de tica e Experimentação Animal
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
CLAE-EM-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas em Paralelo
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector Ultravioleta
FM	Fase Móvel
FE	Fase Estacionária
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
DAD	Detectores UV por Arranjo de Diodos
P.I	Padrão Interno
Ap.i	área do Padrão Interno
CV	Coefficiente de Variação
CQ-LIQ	Controle de Qualidade do Limite Inferior de quantificação
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
ELL	Extração Líquido-líquido
EFS	Extração em Fase Sólida
AINEs	Anti-inflamatório não Esteroidal
COX	Enzima Cicloxigenase
TZD	Tiazolidina
PGJ2	Prostaglandia J2
LTB4	Leucotrieno B4
RXR	Receptor de cido Retinóico

PPAR α	Receptor Proliferador de Peroxissoma α
PPAR δ	Receptor Proliferador de Peroxissoma δ
PPAR β	Receptor Proliferador de Peroxissoma β
PPAR γ	Receptor Proliferador de Peroxissoma
VCCLAB	Virtual Computational Chemistry Laboratory
ACN	Acetonitrila
LC-MS-IT-TOF	Epectrômetro de Massas Ion-trap Time of flight da Shimadzu
MeOH	Metanol
CQs	Controles de Qualidade
D.P.R	Desvio Padrão Relativo

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Grau Celsius
λ (lambda)	Comprimento de onda em nanômetros
mL	Mililitros
mL/min	Mililitros por minuto
nm	Nanômetros
mm	Milímetros
μ m	Micrômetros
m.V	Milivolt
AU.min	Unidades de absorbância por minuto
K	Fator de retenção
α	Fator de seletividade
C ₁₈	Octadecilsilano
C-8	Octilsilano
C-4	Butilsilano
C-3	Propilsilano
CN	Ciano
Log k	Coeficiente de dissociação
logP	Coeficiente de partição
logS	Coeficiente de solubilidade
QSAR	Relação estrutura-atividade
Log k	Coeficiente de dissociação
logP	Coeficiente de partição
logS	Coeficiente de solubilidade

ANEXO

Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco- Processo nº 23076.024803/2009-18

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	A técnica cromatográfica.....	3
2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	4
2.2.1	Fases estacionárias: separação cromatográfica.....	5
2.2.2	Sistema de solventes (fase móvel).....	7
2.3	O papel da CLAE na Descoberta de Novas Drogas.....	8
2.4	Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica em CLAE.....	9
2.4.1	Aspectos gerais do desenvolvimento.....	9
2.4.2	Propriedades físico-químicas da amostra analisada.....	10
2.4.3	Solubilidade dos componentes da amostra.....	10
2.4.4	Fase Móvel.....	11
2.4.5	Adição de agentes tamponantes à fase móvel.....	11
2.4.6	Eluição isocrática e eluição por gradiente em fase reversa	11
2.4.7	A seleção de outros parâmetros cromatográficos.....	12
2.4.8	A escolha do detector	13
2.5	Métodos de padronização.....	15
2.5.1	Padronização externa.....	15
2.5.2	Padronização interna.....	16
2.6	Validação de Métodos Cromatográficos Bioanalíticos.....	17
2.6.1	Seletividade.....	18
2.6.2	Linearidade.....	18
2.6.3	Precisão.....	19
2.6.4	Exatidão.....	20
2.6.5	Limite inferior de quantificação e Limite de Detecção.....	20
2.6.6	Amostras de controle de qualidade.....	21
2.6.7	Estudo de estabilidade do fármaco em matrizes biológicas.....	22
2.7	Recuperação.....	23
2.7.1	Métodos de extração e “clean-up” de amostras.....	24
2.7.1.2	Extração líquido-líquido (ELL)	25
2.7.1.3	Extração em Fase Sólida (EFS)	25

2.7.1.4 Extração por Precipitação Protéica.....	27
2.9 Tiazolidinedionas e novas perspectivas de tratamento para a inflamação.....	28
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos:	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Materiais.....	36
4.1.1 O Composto LPSF/GQ-113B.....	36
4.1.2 Equipamento.....	36
4.1.3 Coluna cromatográfica.....	35
4.1.4 Solventes	36
4.1.5 Matriz biológica (plasma)	37
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Obtenção do plasma a partir de ratos Wistar	37
4.2.2 Determinação das características físico-químicas do LPSF/GQ-113B.....	37
4.2.3 Obtenção do espectro de varredura na região do UV-Vis do LPSF/GQ-113B.....	38
4.2.4 Seleção da fase estacionária mais adequada.....	38
4.2.5 Confirmação da identidade do composto através da massa molecular utilizando um espectrômetro de massas.....	39
4.2.6 Modo isocrático e modo por gradiente.....	39
4.2.7 Análise de cromatogramas de amostras de plasma branco.....	39
4.2.8 Testes para obtenção da fase móvel mais adequada.....	40
4.2.9 Definição de outros parâmetros cromatográficos (fluxo e temperatura).....	39
4.2.10 Testes de estabilidade.....	40
4.2.11 Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LC).....	42
4.2.12 Amostras de controle de qualidade.....	43
4.2.13 Preparação das soluções máster e soluções de trabalho.....	43
4.2.14 Contaminação de amostras de plasma branco com o LPSF/GQ-1.....	44
4.2.15 Extração do LPSF/GQ-113B.....	44
4.2.16 Seletividade.....	46
4.2.17 Preparação da Curva de Calibração.....	46
4.2.18 Linearidade.....	47

4.2.19	Precisão intra e inter-dias.....	47
4.2.20	Exatidão intra e inter-dias.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Características físico-químicas do composto LPSF/GQ-113B.....	49
5.2	Solubilidade do composto LPSF/GQ-113B em solventes orgânicos.....	49
5.3	Espectro de varredura na região do UV-Vis da droga.....	49
5.4	Confirmação da identidade do composto por espectrometria de massas.....	50
5.5	Delineamento da fase móvel ideal.....	51
5.6	Delineamento do fluxo e da temperatura do forno	54
5.7	Estudos de estabilidade do LPSF/GQ-113B.....	55
5.8	Recuperação.....	56
5.9	Seletividade.....	57
5.10	Limite inferior de detecção e limite inferior de quantificação.....	58
5.11	Curva de Calibração e Linearidade.....	58
5.12	Precisão e Exatidão.....	61
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	68
8	PERSPECTIVAS.....	70
9	REFERÊNCIAS.....	71
10	ANEXOS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de uma nova droga, diversas pesquisas e experimentos precisam ser contemplados para a obtenção do maior número de dados possíveis sobre o novo composto candidato a fármaco. Parte dos experimentos iniciais é realizada em animais (*in vivo*), chamados de estudos pré-clínicos, para avaliação, por exemplo, da atividade farmacológica, toxicidade, eficácia e farmacocinética.

A compreensão de como uma droga se comporta em um organismo vivo (absorção, distribuição, metabolização e excreção), após sua administração, pode ser viabilizada através de ensaios de alta sensibilidade *in vitro* que permitem a quantificação da mesma e de seus metabólitos em fluidos biológicos, e para isso, é necessário que uma metodologia analítica seja desenvolvida e validada previamente, de modo que esteja dentro de padrões de confiabilidade, exatidão e reprodutibilidade.

No Brasil a RDC 899 da ANVISA regulamenta a validação de métodos bioanalíticos, e determina que algumas etapas sejam realizadas e documentadas. Os parâmetros analíticos normalmente determinados são: precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, estabilidade e recuperação, adequadas à análise (BRASIL, 2003; ARAGÃO *et al*, 2009).

A terapêutica moderna da inflamação envolve principalmente a interrupção na síntese ou ação de mediadores críticos que conduzem à resposta a lesão, no entanto, apesar dos grandes avanços na compreensão subjacente a fisiopatologia das condições inflamatórias e o advento de muitos medicamentos similares aos clássicos, poucas são as novidades realmente significantes.

Classicamente a inflamação é tratada com o emprego de anti-inflamatórios não-esteroidais AINES através da inibição da enzima cicloxigenase (COX), enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (mediador inflamatório nociceptivo). O bloqueio das duas isoformas, cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) é o mecanismo de interrupção da inflamação mais corriqueiramente utilizado (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998). No entanto, sabe-se que o bloqueio da via COX-1 inibe também funções fisiológicas benéficas, e a inibição da COX-2, pode vir a ocasionar efeitos danosos para o sistema cardiovascular (BARREIRO *et al*, 2002; ARAÚJO *et al*, 2005).

Nas últimas décadas os derivados tiazolidinônicos, se tornaram uma importante classe de compostos heterocíclicos para os quais diversas propriedades farmacológicas foram atribuídas (OMAR, SALAMA, ESHBA, 1985), dentre estas, a atividade anti-inflamatória, através da interação com o receptor ativador do proliferador de peroxissoma (PPAR), seu alvo biológico.

O surgimento dessa classe de substâncias bastante promissora despertou o interesse do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, que faz parte do Grupo de Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco a sintetizarem e avaliarem uma gama de derivados com o mesmo núcleo tiazolidínico. Em pesquisas realizadas recentemente pelo grupo, a atividade anti-inflamatória destes novos compostos tiazolidinônicos foram confirmados nos trabalhos de SANTOS 2005, COUTO 2006, PEREIRA 2007, MAGALHÃES 2007 e SANTOS 2009.

Dentre a série química sintetizada por Silva (2008), o composto LPSG/GQ-113B, demonstrou atividade anti-inflamatória mais relevante que os demais da série avaliada. Identificando a importância de aprofundar estudos farmacológicos da molécula LPSG/GQ-113B como potencial fármaco anti-inflamatório, fez-se necessário o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação quantitativa do LPSG/GQ-113B em plasma de ratos Wistar.

Nesse contexto um método bioanalítico para determinação do LPSG/GQ-113B, sensível e seletivo foi desenvolvido e validado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector ultravioleta (CLAE-UV). A recuperação do analito se deu através da precipitação protéica por acetonitrila, com taxa de recuperação do LPSG/GQ-113B acima de 90%. A amostra foi submetida a uma separação seletiva, utilizando uma coluna analítica Phenomenex® C₁₈ 5 μ (150mm x 4.6mm), acondicionada no forno acoplado a uma temperatura de 40 °C.

Uma vez que o método foi devidamente desenvolvido e validado, atendendo aos critérios bioanalíticos de precisão, exatidão e linearidade, pode assim ser aplicado a experimentos que exijam a determinação quantitativa do composto LPSG/GQ-113B em plasma de ratos Wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Técnica Cromatográfica

A Cromatografia é uma técnica físico-química de separação de componentes presentes em uma mistura em condições específicas. Essa mistura é submetida a um processo de particionamento entre duas fases que ficam em contato íntimo, a fase estacionária (FE), geralmente de grande área e a fase móvel (FM). A fase móvel é capaz de percolar a fase estacionária arrastando os componentes de uma determinada preparação, tornando possível a interação entre as partículas móveis e as fixas, promovendo assim, uma separação diferencial de componentes de uma mistura (CIOLA, 1998; NETO & NUNES, 2003; LANÇAS, 2009).

O processo de cromatografia, segundo MEYER, 2004, ocorre como resultado de repetidas etapas de sorção e dessorção durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação é devido às diferenças nos coeficientes de distribuição individuais de cada analito na amostra e está ilustrado na FIGURA 1.

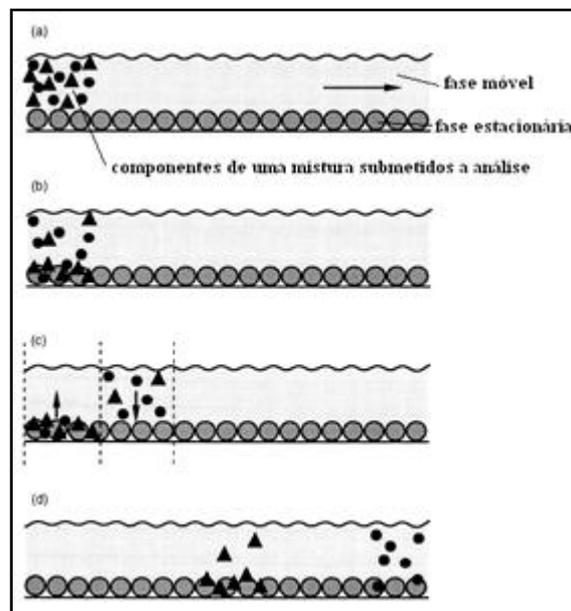


Figura 1. Representação de uma separação cromatográfica (adaptado de MEYER, 2004)

- a) A amostra é aplicada ao sistema cromatográfico e os componentes da mistura arrastados pela fase móvel entram em contato íntimo com a fase estacionária.
- b) Nesse momento é de fato iniciada a migração diferencial dos compostos pelas interações físico-químicas intrínsecas às moléculas em contato com a FE.

- c) Um novo equilíbrio é atingido pela eluição dos compostos impulsionados pela fase móvel percolada. Num primeiro instante ocorre a sorção das moléculas em seguida a dessorção das mesmas.
- d) Após diversas repetições desse processo, os dois componentes são finalmente separados. O componente representado pelo símbolo (●) apresenta menor afinidade pela FE e maior afinidade pela FM isso faz com que ela seja eluída mais rapidamente que a outra substância (▲), esta apresenta maior afinidade pela FE, o que permite que essa seja mais retida e seja eluída mais vagarosamente.

2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida clássica é uma técnica muito utilizada para separação e identificação de produtos naturais e na purificação de produtos na síntese de compostos. Ao longo da evolução da técnica as partículas utilizadas sofreram um processo de miniaturização gerando colunas mais densamente compactadas que passaram a oferecer maior resistência à passagem da fase móvel, necessitando-se do uso de um aparato que forçasse essa passagem, o que resultou na criação de bombas para pressurização do sistema (LANÇAS, 2009).

A necessidade de forçar o fluxo da fase móvel através de colunas com recheios porosos cada vez menores trouxe investimentos em tecnologias para desenho e construção de um equipamento automatizado com capacidade para bombear a fase móvel através de uma coluna cromatográfica com fase móvel densamente compactada, juntamente com um sistema de injeção de amostra e detector capaz de fazer a leitura dos compostos presentes na amostra submetida à análise. Esse equipamento viabilizou a técnica para análise de compostos mais difundida atualmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (MEYER, 2004).

Atualmente a CLAE é a técnica de separação mais utilizada nos laboratórios, devido à praticidade nas determinações quantitativas acuradas, compreende a maior parcela de produtos sujeitos à análise quando comparada à cromatografia gasosa. Tanto a versatilidade quanto a adequação do equipamento para a variação de fases estacionárias, fases móveis, variações de fluxo, temperatura, entre outras condições, permite que esse método tenha uma ampla aplicabilidade em diversos ramos da ciência como na análise de alimentos, fitoterapia, toxicologia, de íons inorgânicos, área bioanalítica, proteoma, genoma, etc. (NASCIMENTO, 2004).

2.2.1 Fases Estacionárias (Separação Cromatográfica)

A coluna cromatográfica pode ser considerada o componente principal do sistema, pois é nela que ocorre a separação (LANÇAS, 2009), no entanto, é a seleção criteriosa do par fase móvel/fase estacionária que define a eficiência da separação cromatográfica dos componentes que fazem parte de uma amostra. Essa combinação entre fases distintas e as características físico-químicas de interação entre os compostos sujeitos à análise com e ambas as fases, FE e FM, será crucial para obtenção de resultados satisfatórios e para o planejamento de ajustes necessários. (NETO & NUNES, 2003; BEDOR, 2007).

O tamanho da partícula controla o processo de difusão dos compostos da amostra ao permitir a entrada e saída de substâncias solúveis nos poros da partícula. Quanto maior o tamanho da partícula porosa, mais vagaroso o processo de difusão, e, por conseguinte, mais lentamente ocorre o processo de transferência de massa (compostos solúveis) entre a FE e a FM. O tempo de retenção das moléculas na fase estacionária é diretamente proporcional ao tamanho das partículas usadas, associada a uma porosidade mais profunda, o que consequentemente faz com que as substâncias demorem mais ou menos tempo no interior da coluna (CIOLA, 1998; MEYER, 2004; LANÇAS, 2009).

Conforme houve uma diminuição no tamanho das partículas que preenchem o interior da coluna e da profundidade dos poros das mesmas, a transferência de massa (entrada e saída) das substâncias passou a acontecer mais rapidamente, permitindo análises rápidas, sem perda de eficiência. A redução das partículas que compunham a fase móvel, logo favoreceu a diminuição do tamanho das colunas, também sem perda de eficiência (CIOLA, 1998).

Em CL moderna, o principal material empregado nos últimos vinte anos como preenchimento de colunas, é quase em sua totalidade, a sílica ou o óxido de silício. Outros óxidos têm surgido recentemente para utilização como FE, a zircônia (óxido de zircônio) e titânia (óxido de titânio) podem ser citados (LANÇAS, 2009).

A sílica pode se apresentar quimicamente inalterada e manter seus grupos polares ativos superficiais a partícula, são esses, grupos silanóis livres, em posição vicinal ou geminal, mostrados na FIGURA 2a. Além da possibilidade de ocorrência de adsorção física de água na superfície e a formação de siloxanos (PRADO *et al*, 2005), a sílica nessas condições tem como mecanismo de separação a adsorção. Quando é utilizada dessa maneira, o método de separação ocorre em fase normal e sua função é a de separar compostos de natureza mais polar (SOARES, 2006).

A mesma sílica pode ser modificada e servir como base para ligação de grupamentos químicos que alterem seus radicais superficiais livres e conseqüentemente sua polaridade, fase ligada. As colunas de fase ligada foram essenciais para o grande avanço alcançado na análise quantitativa de compostos e pela predileção da CLAE entre os analistas. A FIGURA 2b exemplifica a fase ligada octadecilsilano (C_{18}) (MEYER, 2004).

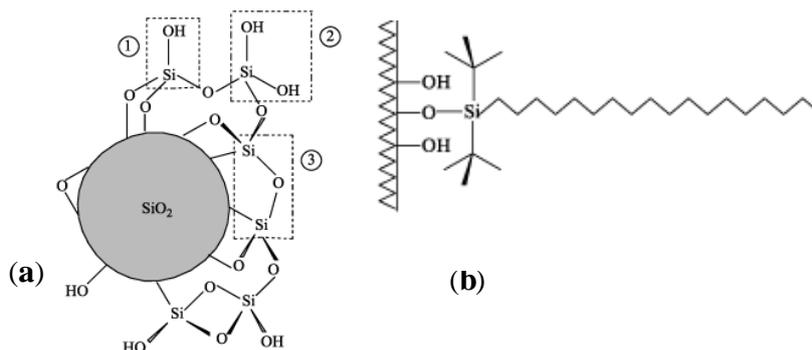


Figura 2. (a) Esquema da estrutura da sílica gel, mostrando em (1) silanol vicinal, (2) silanol geminal e (3) siloxano. Em (b) Estrutura da fase Zorbax SB-C18 da Agilent, com grupos isobutílicos ligados diretamente ao átomo de silício e uma cadeia n-alquílica do tipo C_{18} (adaptado de SILVA, 2006; PRADO *et al*, 2005).

A fase ligada mais comum é a fase reversa, na qual, à sílica, são adicionadas cadeias de hidrocarbonetos saturadas compostas de dois a trinta carbonos, o que torna sua natureza apolar. Na fase reversa, a separação é compreendida pelo fenômeno da partição líquido-líquido e a taxa de retenção dependerá das características hidrofóbicas dos compostos em análise. Fases ligadas de natureza polar são classificadas como de fase normal (SOARES, 2006). Abaixo estão listados alguns tipos de fase reversa: C-18 (octadecilsilano), C-8 (octilsilano), C-4 (butilsilano), C-3 (propilsilano). Outras fases quimicamente ligadas podem ser: Ciano (CN), fenil, feniletil, fenilbenzil, diol e glicerol (CIOLA, 1998; MEYER, 2004; LANÇAS, 2009).

Atualmente percebe-se que há uma predileção por colunas cromatográficas com as seguintes características: Octadecilsilano (C-18) como fase ligada, coluna de 10-15 cm, diâmetro interno em torno de 4,6 mm e tamanho de partícula (sílica) de 5 microns. Estas demonstraram experimentalmente resultados favoráveis com ótimas separações, seletividade e reprodutibilidade intra e inter-análises.

2.2.2 Sistema de solventes (fase móvel)

A definição do(s) solvente(s) da fase móvel em um estudo pode ser uma tarefa complicada e consumir bastante tempo, embora haja softwares que propõem auxiliar na escolha da FM pelo operador. Na prática, para se definir a FM final, faz-se necessário testes experimentais, tomando como base informações descritas na literatura que auxiliem o seu delineamento (LANÇAS, 2009).

Segundo CIOLA, 1998, uma grande variedade de fatores está implicada na definição da fase móvel, onde os principais são:

- Propriedades físico-químicas que afetam a solubilidade, a partição, a adsorção e, portanto a separação (polaridade, viscosidade, constante dielétrica, etc.);
- Propriedades físicas que afetam a possibilidade de detecção (comprimento de onda em que o solvente absorve);
- Propriedades que afetam a segurança (toxidez, inflamabilidade, etc.);
- Custo elevado de alguns solventes;

A fase móvel usada em cromatografia, especialmente em CLAE, deve preencher requisitos básicos para sua utilização, esta deve ter as seguintes características: ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação, ser capaz de solubilizar a amostra sem decompô-la, apresentar baixa viscosidade, ser compatível com o tipo de detector utilizado e ter polaridade adequada ou ajustada de acordo com a fase estacionária utilizada no ensaio (AQUINO-NETO, 2003; MEYER, 2004).

Difícilmente será utilizado apenas um solvente em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido às complicações em ajustar a força do solvente e à seletividade dentro da gama de solventes comumente empregados. Na realidade, o planejamento de um estudo cromatográfico, inicia-se antes com a definição da coluna (FE) que seja mais adequada para a separação desejada e só assim, planeja-se a FM que irá aperfeiçoar a retenção (k) e a seletividade (α) do sistema de separação (LANÇAS, 2009).

Devido a características da amostra, se tiver natureza ácida, ou básica, ou ainda neutra, pode ser necessário alterar sua ionização com adição de tampões ácidos ou básicos à fase móvel, de modo a aperfeiçoar o processo de retenção e/ou separação (KAZEKEVICH & LOBRUTTO, 2007)

Utilizando uma coluna com fase ligada reversa, antes de iniciar a injeção das amostras, é necessário que a coluna seja condicionada com a passagem de solventes puros, com uma

vazão entre 1,0 e 1,5 mL/min até que a linha de base do detector se estabilize. Esse procedimento é mais aconselhável quando a coluna não está em uso por algum tempo, ou quando se deseja mudar de fase móvel (CIOLA, 1998).

2.3 O Papel da CLAE na Descoberta de Novas Drogas

Quando novas drogas são desenvolvidas, estas passam por diversos estudos até que possam chegar ao mercado farmacêutico. Na maioria das vezes, o período de desenvolvimento desde a pesquisa até a utilização clínica do fármaco em humanos perdura por anos e milhões de dólares são gastos (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Ainda no período de desenvolvimento inicial, a droga candidata a fármaco passa por diversos estudos pré-clínicos em animais, para avaliação de sua atividade farmacológica, toxicidade, eficácia, farmacocinética, etc. Métodos bioanalíticos quantitativos são usados largamente em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, contribuindo fortemente para que projetos de pesquisa alcancem resultados favoráveis (KORFMACHER, 2005).

O foco da indústria farmacêutica tem sido aumentar a capacidade de êxito nesse processo de desenvolvimento de moléculas promissoras, através do aperfeiçoamento de etapas envolvidas no processo de descoberta, o que abrange uma sequência de eventos: planejamento e desenho molecular, síntese orgânica, análises do composto e purificação, registro, estudos farmacocinéticos e farmacológicos. Para aperfeiçoar cada etapa num processo de descoberta multidisciplinar, é esperado que o número de complicações no decurso das descobertas de compostos seja dramaticamente reduzido e avance para o desenvolvimento pré-clínico (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Tanto a CLAE quanto a CLAE-EM (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas) desempenham um papel importante em todo o processo de desenvolvimento e descoberta, uma vez que são consideradas ferramentas essenciais para bioanalistas em quase todas as fases do processo.

O início da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas candidatas a fármacos acontece com a definição da área terapêutica de trabalho. Como exemplo: oncologia, doenças metabólicas, dor e inflamação, etc. Sequencialmente o próximo passo é identificar os mais relevantes alvos biológicos para a doença, e então fazer uma triagem em bibliotecas de compostos químicos para a escolha de prováveis ativos com o auxílio de estudos da relação estrutura-atividade (REA). Dados gerados a partir desses processos de triagem de alta capacidade, incluindo a incorporação de conhecimentos químicos e dimensionais das

proteínas alvo a partir de ferramentas computacionais (estudos “in silico”), para mensurar a diversidade e “drug-likeness”, como também, modelos farmacofóricos bidimensionais e tridimensionais, dados que podem prever a atividade biológica e dar suporte ao desenho de compostos, síntese e testes biológicos. (KORFMACHER, 2005).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência combinada com espectrometria de massas (CLAE-EM) ou espectrometria de massas em paralelo (CLAE-EM-EM) revelou-se a técnica analítica de escolha para a maioria dos testes utilizados em vários estágios de descoberta de novos medicamentos (ACKERMANN et al, 2002)

CLAE-EM e CLAE-EM-EM são técnicas utilizadas para a análise de novos compostos sintetizados, aplicando-se para verificar a pureza dos compostos frente a interferentes originados na rota sintética, na determinação de várias propriedades físico-químicas (solubilidade fisiológica, permeabilidade e estabilidade química), determinação de metabólitos provenientes de compostos estudados e elucidação de parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção) (KORFMACHER, 2005).

2.4 Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Analítica em CLAE

Quando se pretende desenvolver um método cromatográfico, há muitos fatores a considerar. Inicialmente é ideal que o máximo de informações sobre a substância seja conhecido, especialmente suas propriedades físico-químicas: pKa (coeficiente de dissociação), logP (coeficiente de partição), logS (coeficiente de solubilidade), estrutura química, peso molecular, espectro de absorção ultra-violeta, entre outros (BOULANGER et al, 2003; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

2.4.1 Aspectos Gerais do Desenvolvimento

Antes do início da análise é essencial que amostra seja preparada e as etapas por qual a mesma é obtida desempenham papel fundamental no método de desenvolvimento, visto que isso pode afetar o resultado cromatográfico e a recuperação do analito. Quanto mais complexa a matriz em que se encontra o composto de interesse, mais etapas na preparação da amostra serão necessárias como filtração, centrifugação, precipitação, agitação, congelamento, particionamento e sonicação (LANÇAS, 2004)

Determinar a estabilidade da solução nos solventes (fase móvel e diluente) e na matriz é uma etapa crítica durante o desenvolvimento inicial do método. Se a solução obtida não apresenta estabilidade, o estudo torna-se inviável e essa etapa precisa ser reavaliada.

A seleção da fase móvel e a eluição de forma isocrática ou em condições de gradiente dependerá da natureza iônica do analito e de sua polaridade. Esses dois fatores intrínsecos à molécula provavelmente influenciarão bastante na seletividade do analito especialmente quando se trata de compostos ionizáveis (VINOD et al, 1992; BOULANGER et al, 2003).

A escolha da fase estacionária é muito importante no processo separativo dos componentes da amostra. As características da molécula, principalmente sua hidrofobicidade, determinarão a escolha por uma fase no modo normal ou reversa. Diferentes fases estacionárias proporcionam diferentes seletividades entre componentes detectáveis, porém em uma mesma fase, essa propriedade pode ser alterada com mudanças na fase móvel, entre essas a variação do pH (VINOD et al, 1992; LANÇAS, 2009).

2.4.2 Propriedades Físico-Químicas da Amostra Analisada

Se o analito é ionizável, o pKa deve ser determinado experimentalmente. Caso isso não seja possível, um valor teórico para a constante pode ser calculado através de softwares especializados. O coeficiente de partição (LogP) é outra propriedade físico-química importante que norteará a escolha da melhor fase móvel (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

2.4.3 Solubilidade dos Componentes da Amostra

Para análise de substâncias em CLAE, é necessário que as mesmas sejam totalmente solúveis em determinado solvente ou mistura destes. Os solventes usados na fase móvel e também os diluentes da amostra, devem ser inertes frente aos componentes sob análise, não gerando produtos de degradação (SNYDER, 1997; CIOLA, 1998; BOULANGER et al, 2003).

Caso o tipo de detector acoplado ao equipamento seja por ultravioleta (UV), os componentes orgânicos da fase móvel e da solução diluente, idealmente não devem ser detectáveis, para que não haja interferências na detecção nas substâncias de interesse.

2.4.4 Fase Móvel

Os principais fatores que devem nortear a escolha adequada da fase móvel, como já citados acima, são o pKa e o Log P. Se ocorre a ionização dos analitos, e se o pKa do analito alvo estiver disponível, é possível através do controle do pH e da polaridade do eluente, determinar uma corrida mais lenta ou mais rápida, manipulando o grau de ionização dos componentes.

2.4.5 Adição de Agentes Tamponantes à Fase Móvel

A fim de desenvolver métodos mais eficientes em CLAE, a escolha de um tampão pode ser necessária. Os tampões têm a capacidade de manter uma solução resistente a pequenas variações de pH, e em algumas análises a manutenção do pH da fase móvel pode otimizar a separação dos componentes, além de estabelecer reprodutibilidade e robustez ao método (LANÇAS 2004; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

2.4.6 Eluição Isocrática e Eluição por Gradiente em Fase Reversa

Denomina-se eluição isocrática a composição química da fase móvel (solvente puro ou uma mistura de solventes) que permanece inalterada do início ao fim da análise cromatográfica. Caso ocorram alterações propositais na fase móvel ao longo da análise, o processo é denominado gradiente de eluição (LANÇAS, 2009). Na verdade, a composição constante do eluente se traduz em manutenção das condições de equilíbrio na coluna e em velocidade constante de deslocamentos dos compostos através da coluna (SNYDER, 1997; CIOLA, 1998; MEYER, 2004).

As interações do analito com a fase móvel e a fase estacionária, também são constantes durante toda a corrida, isso faz com que as separações isocráticas sejam mais previsíveis, embora o poder de separação de compostos com tempos de retenção semelhantes possam apresentar baixa resolução (MEYER, 2004).

O que irá definir a utilização do sistema no modo isocrático ou em gradiente são as características da amostra, o que diz respeito ao número de componentes, a polaridade destes, a coeluição e retenções semelhantes dos analitos, a baixa resolução e capacidade entre sinais. Caso o número de componentes detectáveis na amostra seja pequeno e esses não apresentarem

retenção semelhante, a eluição isocrática é a mais simples e vantajosa (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A eluição em gradiente aumenta significativamente o poder de separação de um sistema multicomponente, principalmente por causa do aumento dramático da eficiência aparente (diminuição da largura dos picos). Nesse modo, a proporção dos componentes da fase móvel é alterada ao longo da análise, baseando-se nas características dos analitos que se deseja separar, no entanto, a reprodutibilidade para esse método pode representar um desafio devido a pequenas variâncias no processo (MEYER, 2004; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007)

A eluição por gradiente é normalmente empregada na análise de amostras complexas multicomponentes, pois pode não ser possível obter um valor para o fator de separação k entre 1 e 10, o que traduz uma separação adequada entre os componentes eluídos, usando uma fase móvel isocrática. A maioria dos equipamentos modernos HPLC pode reproduzir eluições em gradiente com alta precisão, mas permanecem variações na composição da fase móvel e usualmente o estresse causado a coluna pelo pH pode diminuir sua vida útil. Geralmente a faixa de operação de pH usual em colunas de sílica para que não haja danos a estrutura interna da coluna é de 2.5 a 7.5 (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Quando o método do gradiente é utilizado, a coluna deve ser novamente condicionada antes da injeção da próxima amostra, passando a fase móvel em sua composição inicial por algum tempo até a estabilização do sistema para o início da execução do gradiente seguinte (LANÇAS, 2009).

2.4.7 A seleção de outros parâmetros cromatográficos

Além das propriedades inerentes as fases móvel e estacionária para a obtenção de corridas cromatográficas em padrões ótimos. O ajuste do fluxo (vazão) da fase móvel no sistema cromatográfico é essencial para o controle da velocidade de análise. O fluxo deve ser regulado também em função de algumas características do sistema como a pressão suportada e diâmetro interno da coluna.

Em CLAE a viscosidade dos solventes influencia diretamente nos processos separativos, pois quanto mais fluida a fase móvel, menor será a dificuldade encontrada para atravessar os espaços entre as partículas da coluna, dessa forma a eluição dos componentes da amostra acontece de maneira mais rápida.

2.4.8 A Escolha do Detector

A escolha do detector em CLAE no desenvolvimento do método analítico é dependente das propriedades do analito. Diferentes tipos de detectores estão disponíveis, tais como, a detecção por ultravioleta (UV), por fluorescência, por espectrometria de massas, por índice de refração (IR), entre outros. No entanto, o detector mais popularizado para análises de cromatografia líquida em fase reversa é o ultravioleta, devido a sua boa sensibilidade e custo mais acessível (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Dentre outras especificações, podem ser classificados de acordo com a sua seletividade em: detectores universais, seletivos e específicos. Os detectores universais abrangem uma gama maior de detecção, pois são sensíveis à detecção de qualquer composto da amostra que não seja a fase móvel, já os detectores seletivos, respondem a um grupo de componentes efluentes da coluna. Por último, os detectores específicos, respondem a apenas um ou um conjunto muito restrito de componentes contendo características químicas similares (LANÇAS, 2009).

A sensibilidade de um detector é definida como sinal de saída por unidade de concentração ou massa de um soluto, presente na fase móvel, que passa pelo detector. O ruído de da linha de base é importante na determinação do limite inferior de detecção (LID) e o limite inferior de quantificação (LIQ), parâmetros exigidos na validação cromatográfica de métodos bioanalíticos (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2009).

Embora haja atualmente uma crescente popularização na utilização dos detectores de massas, os detectores UV continuam sendo mais acessíveis, com sensibilidade e detectabilidade favoráveis. Apresentam uma maior seletividade no grupo de compostos que o sensibiliza, um grupo de moléculas chamadas cromóforas, moléculas geralmente heterocíclicas com ligações duplas e simples alternadas. A análise UV é muito utilizada na análise dos fármacos devido a grande maioria destes apresentarem moléculas com tais características estruturais.

Na detecção UV o comprimento de onda ótimo deve ser selecionado de forma que o composto tenha absorvância máxima, permitindo a maior seletividade e sensibilidade. Para a seleção do comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima é preciso submeter à amostra a uma varredura entre comprimentos que passem do ultravioleta até o visível, o espectro em forma de gráfico, indicará o melhor comprimento de onda a ser selecionado.

Existem alguns tipos distintos de detectores UV, são eles: detectores UV de comprimento de onda fixa, detector UV de comprimento de onda variável, detectores UV por arranjo de diodos (DAD).

O detector por UV fixo é o mais simples e menos oneroso detector fotométrico usado em CLAE. Neste equipamento emprega-se como fonte de energia uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão, cuja fonte maior de emissão ocorre próximo a 254 nm, a troca dos filtros nesse detector permite trabalhar com outros componentes de onda, dependendo da necessidade. Apesar da simplicidade, baixo custo e boa sensibilidade destes detectores, seu emprego tem constantemente diminuído, após o aparecimento dos detectores de comprimento de onda variável (MEYER, 2004; LANÇAS, 2009).

Os detectores UV de comprimento de onda variável apresentam como principal vantagem o fato de se poder escolher diferentes comprimentos de onda, inclusive a funcionalidade de se analisar uma mesma amostra sob comprimentos de onda diferentes, detectando dessa forma possíveis substâncias que absorvam em comprimentos distintos, ou ainda, permite a obtenção de uma varredura de espectro completo de qualquer pico cromatográfico detectado. A operação desse equipamento é baseada na de um espectrofotômetro UV-VIS com uma cela em fluxo ao invés de uma estática. O emprego de um seletor de comprimentos de onda (λ), permite selecionar diferentes valores de λ durante a análise, podendo selecionar a melhor absorção para cada composto em análise (HUBERT et al, 1999; MEYER, 2004).

O terceiro tipo é o DAD, detector por arranjo de diodos. Cada diodo monitora uma faixa estreita de comprimentos de onda e, no final da análise, toda a região de interesse foi varrida, e os dados obtidos fornecem o espectro de absorção da substância.

A adequação dos parâmetros do sistema em CLAE com seus respectivos critérios de aceitação devem ser um requisito para o desenvolvimento e validação de qualquer método. Isto irá fornecer um nível adicional de confiança de que a fase móvel correta, temperatura, fluxo e coluna foram selecionados para garantir o melhor desempenho do sistema. Este é um processo dinâmico e, como o usuário adquire mais experiência com o método, a amplitude de compreensão dos critérios é expandida até que o método é finalmente validada para tal destino (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2009).

2.5 Métodos de Padronização

A análise quantitativa em cromatografia líquida tem por objetivo determinar com confiabilidade a concentração de um ou mais componentes presentes na amostra e, sempre que possível avaliar o erro associado a esta determinação. Usualmente o erro é representado estatisticamente. Segundo Lanças (2009), o procedimento quantitativo em CL, normalmente envolve as seguintes etapas:

- Amostragem
- Preparo de amostras
- Análise cromatográfica
- Integração
- Cálculos

A interpretação dos dados gerados na avaliação do cromatograma se dá através de picos, cada pico é gerado em função da detecção de um componente pelo detector acoplado ao cromatógrafo líquido. As dimensões de cada sinal gerado (área x altura) são diretamente proporcionais à concentração de cada analito presente na amostra analisada (CIOLA, 1998; MAYER, 2003; LANÇAS; 2004).

Após obter-se a área do pico, com o método de integração, é necessário relacioná-lo com a concentração do analito. Atualmente existem softwares de fácil manipulação que facilitam a integração dos picos e geram resultados proporcionais a concentração dos componentes detectados. No entanto, há outras possibilidades para calcular a concentração dos sinais gerados durante uma corrida cromatográfica, citados abaixo (CIOLA, 1998).

Para a construção da curva de calibração em validações quantitativas de fármacos em fluidos biológicos, os modelos de padronização preferidos são a padronização externa e a padronização interna.

2.5.1 Padronização Externa

Nesse caso, o analista opta por determinar a concentração desconhecida do componente de uma amostra a partir de um gráfico de calibração. A calibração é realizada previamente, lançando-se as áreas dos picos obtidos (desconhecidos) contra as áreas dos

padrões (concentrações conhecidas). Em seguida injeta-se a amostra cuja concentração se pretende conhecer, determina sua área e a lança no gráfico de calibração (SNYDER, 1997).

A padronização externa embora menos utilizada na validação de métodos bioanalíticos de fármacos pode ser utilizada, quando se há dificuldades em determinar uma molécula que cumpra seu papel de padrão interno, o que pode acontecer quando se pretende analisar um novo composto com estrutura molecular inédita. A padronização externa não impede que o método seja desenvolvido e validado segundo as exigências aplicáveis a tais metodologias (SNYDER, 1997).

2.5.2 Padronização Interna

O padrão interno (P.I) é um composto que se adiciona a amostra contendo o componente cuja massa se pretende determinar, de forma que não interfira na análise. É aconselhável que o composto escolhido como padrão interno apresente grau de pureza elevado, ser bem resolvido dos outros picos, ser adicionado em concentrações similares ao composto analisado e possuir estrutura química semelhante ao composto a ser quantificado.

Deve-se preparar várias soluções do padrão interno e do componente a ser analisado para a construção de uma curva de calibração semelhante àquela construída no padrão externo, com diferença de que agora a área da amostra (A_a) é dividida pela área do padrão interno ($A_{p.i.}$) e lançada no gráfico contra a massa da amostra (m_a) dividida pela massa do padrão do P.I. ($m_{p.i.}$) A seguir, mistura-se uma quantidade conhecida do P.I com quantidade conhecida da amostra e a analisa por cromatografia ; obtém-se A_a e $A_{p.i.}$, e calcula-se a razão $A_a/A_{p.i.}$

Obtendo-se este valor, a interpolação do gráfico de calibração permitirá encontrar a razão da massa $m_a/m_{p.i.}$, em seguida, multiplicando-se esse valor ($m_a/m_{p.i.}$) pela massa do padrão interno conhecido, obter-se-á a massa do componente em questão, como está representado na EQUAÇÃO 1.

Equação 1.

$$M_a = \frac{m_a}{m_{p.i.}} \cdot m_{p.i.}$$

Esse método é extremamente útil e robusto, pois independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e tamanho da amostra.

2.6 Validação de Métodos Cromatográficos Bioanalíticos

A fim de garantir a qualidade exigida em resultados analíticos, ensaios cromatográficos devem ser validados, e para isso, necessitam cumprir um protocolo de exigências pré-estabelecidas por órgãos que atestam a confiabilidade da metodologia. O sistema sugerido pelas autoridades públicas de saúde para validação de estudos bioanalíticos difere entre países, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA), os países da Europa seguem o EMEA (European Medicines Agency) e no Brasil, a ANVISA/MS (Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde) ditam as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (HARTMANN et al, 1998; LANÇAS, 2004).

O desenvolvimento de um método não descrito em farmacopéia ou compêndios oficiais deve ser validado. Isso significa atribuir credibilidade e confiança ao mesmo. A validação objetiva diminuir ou controlar os fatores que causam inexatidões de dados gerados. Segundo Lanças (2004), variáveis que são permissivas às discrepâncias no método são muito comuns, o que exige ajustes precisos, tanto no procedimento realizado pelo analista quanto na qualidade do material utilizado, assim como também na calibração do equipamento. Entre essas, as mais comuns são:

- Variabilidade de amostra;
- Eventual contaminação;
- Reagentes inadequados;
- Pipetagem incorreta;
- Variações de Temperatura;
- Variações e descuidos na manutenção do equipamento;
- Calibração ineficiente do equipamento;
- Despreparo do analista;
- Perdas durante a análise, etc.

Métodos bioanalíticos são utilizados para quantificação de fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas. Para esses estudos, atualmente dispõe-se de métodos altamente sensíveis e seletivos para quantificação de compostos em matrizes (sangue, plasma,

soro, urina). Depois de desenvolver o método com os atributos desejados, o mesmo deve ser validado para demonstrar que a metodologia continuará a fornecer dados reprodutíveis, robustos e confiáveis (BANSAL & DeSTEFANO, 2007).

2.6.1 Seletividade

A especificidade ou seletividade deve ser avaliada para demonstrar que os analitos estudados são determinados, e que sua quantificação não é afetada pela presença da matriz biológica, metabólitos conhecidos e/ou produtos de degradação.

A presença de picos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção que a molécula pesquisada, deve ser inferior a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Em ensaios onde a seletividade é elevada, por exemplo, em CLAE-EM, é menos provável que a co-eluição de picos interfira diretamente na quantificação de analitos. O evento em que a matriz biológica interfere na quantificação do analito é conhecido como efeito matriz (BRASIL, 2003; BANSAL & DeSTEFANO, 2007).

2.6.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003).

A faixa linear do método é estimada a partir de uma relação matemática entre a grandeza do sinal medido e a concentração do composto de interesse, facilmente calculada por uma equação de reta $y = ax + b$. Na curva, os coeficientes **a** e **b** podem ser definidos a partir de experimentos com a aplicação da regressão linear. O coeficiente de correlação **r** ou coeficiente de determinação r^2 são modelos usados para determinar a qualidade da curva obtida, quanto mais próximos de **1,0** forem estes valores, menor a dispersão do grupo de pontos medidos experimentalmente e também a incerteza dos coeficientes de regressão esperados (ARAGÃO et al, 2009; LANÇAS, 2009)

A ANVISA determina através de uma Resolução da Diretoria colegiada (RDC) que o valor para o coeficiente de correlação seja igual ou superior a (0,99), e na prática a linearidade do método deve ser confirmada através da construção de diversas curvas, nas quais os resultados sejam reprodutíveis de acordo com o valor de referência padronizado pelo órgão de saúde (BRASIL, 2003).

2.6.3 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (BRASIL, 2003).

Este parâmetro de validação representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições pré-definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (s) representado na EQUAÇÃO (2) (VINOD et al, 1992; HARTMANN et al, 1998; BOULANGER et al, 2003;; ARAGÃO et al, 2009).

$$\text{Equação 2. } s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Na EQUAÇÃO (2), \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições, x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

Na prática, outra expressão mais usada para se calcular a precisão é por meio da estimativa do desvio padrão relativo (D.P.R), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculado através da EQUAÇÃO 3, em que S representa o desvio padrão absoluto. (MEYER, 2004).

$$\text{Equação 3. } CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Em metodologias de validação quantitativas são aceitos coeficientes de variação de até 20% para as concentrações mais baixas, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira de tornar o resultado da precisão mais confiável é aumentando o número de replicatas analisadas (BRASIL, 2003).

Em estudos bioanalíticos a precisão pode ser determinada da seguinte forma: precisão intra-dia, quando medida em um mesmo dia, ou como precisão inter-dias, quando medida ao longo de vários dias. O ensaio deve ser realizado utilizando-se no mínimo três concentrações dos controles de qualidade (baixa, média e alta), realizando-se no mínimo cinco determinações por concentração (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2009).

Para considerar o método preciso, os valores para as expressões de média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação devem ser calculadas. Em metodologias bioanalíticas para quantificação de fármacos em plasma, os valores dos CV entre as determinações da mesma concentração não devem ultrapassar 15%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), o qual se permite valores de até 20%. (BRASIL, 2003; RIBANI et al, 2004).

2.6.4 Exatidão

Segundo a definição do órgão de regulação brasileiro, a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência ou aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003).

De forma semelhante à precisão, a exatidão do método deve ser realizada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação definida para o procedimento. Cada concentração deve ser analisada em quintuplicata (cinco vezes) (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2009).

Em estudos bioanalíticos usando CLAE, a ANVISA também preconiza para essa etapa do estudo a realização de determinações inter e intra-dia e o desvio não deve exceder 15%, exceto para ensaios que utilizam o LIQ, para o qual se admitem desvios de até 20%. A fórmula da exatidão está representada na EQUAÇÃO 4.

Equação 4.
$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração encontrada}}{\text{Concentração verdadeira}}$$

2.6.5 Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão. Chega-se a esse valor por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Além desse, existe o método de determinação do LIQ através do seu sinal-ruído, o qual pode representar uma maior praticidade. O sinal deve se apresentar no mínimo uma área cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco (BRASIL, 2003).

Quando o método das diluições decrescentes é adotado, os sinais correspondentes ao pico de quantificação mínima devem apresentar reprodutibilidade com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%, através da determinação de, no mínimo cinco amostras.

O Limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (sinais correspondentes às variações da linha de base), mas não necessariamente quantificá-lo (RIBANI et al, 2004).

Para ensaios com matrizes biológicas, recomenda-se que o LD seja duas a três vezes superior ao ruído da linha de base. A determinação desse parâmetro, assim como para a determinação do LQ, ocorre com a preparação de soluções do analito num solvente ao qual seja totalmente solúvel. Concentrações decrescentes são analisadas, até que a relação sinal/ruído indicado acima seja alcançada.

Para que os resultados das análises do LIQ e LD sejam confiáveis, é ideal que se consiga equilibrar a fase estacionária com a fase móvel, de modo que a linha de base seja mais estável possível, amenizando os ruídos existentes.

Alguns softwares desenvolvidos para cromatografia, como a CLAE, possibilitam o procedimento utilizando a relação sinal/ruído para calcular o LQ/LD, fornecendo os resultados mais próximos dos valores experimentais.

2.6.6 Amostras de Controle de Qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) são utilizadas para padronizar concentrações específicas da substância em análise durante o estudo de validação. Podem ser definidas como amostras de matriz biológica adicionadas do analito, usadas para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e a validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual (BRASIL, 2003).

As concentrações definidas para as amostras de controle de qualidade são definidas levando em consideração a faixa de concentração da curva de calibração e do limite inferior de quantificação (LIQ), e são divididas em baixa, média e alta concentrações, como está descrito abaixo:

- Controle de qualidade do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ)
- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): menor ou igual a três vezes o LIQ.
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA.

- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

As amostras CQB, CQM, CQA e CQ-LIQ são usadas para determinações da precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

2.6.7 Estudo de Estabilidade do Fármaco em Matrizes Biológicas

A estabilidade de drogas em fluidos biológicos é uma função das condições de estocagem, das propriedades químicas da droga, da matriz e do recipiente a qual está acondicionada. A estabilidade de um analito aplica-se somente a sua presença em uma matriz particular, num recipiente particular e não pode ser extrapolada para outras matrizes e/ou outros recipientes (LANÇAS, 2009).

Amostras de plasma contaminadas com o analito a ser analisado, devem ser submetidas a condições diferentes de armazenamento em baixas temperaturas ou em temperatura ambiente, obedecendo a períodos de tempo específicos. Os estudos de estabilidade podem ser de curta duração, longa duração e por ciclos de congelamento e descongelamento.

O analito presente na matriz biológica de escolha, precisa ter sua estabilidade avaliada durante diversos períodos de tempo e condições de estresse, após armazenagem de curta duração (à temperatura ambiente), de longa duração (congelamento), após ciclos de congelamento e descongelamento e também a avaliação da estabilidade em soluções padrão, preparadas com solventes apropriados em concentrações conhecidas. Todas as amostras submetidas ao estudo de estabilidade devem ser preparadas a partir de uma solução de trabalho recente que é adicionada à matriz biológica em branco e isenta de outros contaminantes exógenos. A estabilidade do analito deve ser atestada frente a condições de armazenamento estressantes, determinada durante três ciclos de congelamento e descongelamento (BRAZIL, 2003).

No estudo que envolve ciclos de congelamento e descongelamento, inicialmente as amostras devem ser congeladas a temperatura de -20° C para o armazenamento e mantidas nessas condições por 24 horas, sendo após esse período, descongeladas à temperatura ambiente. Quando completamente descongelada, as amostras devem novamente ser congeladas a mesma temperatura por um período de 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco na amostra após o terceiro ciclo. Se uma substância apresentar instabilidade na (SHAH et al, 2000; BRASIL, 2003).

Nos testes de estabilidade de curta duração as amostras são submetidas a um período que varia de 4 a 24h em temperatura ambiente. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos em análise de amostras recentes (BRASIL, 2003).

O armazenamento de longa duração deve ter sua estabilidade avaliada e deve exceder o tempo de análise em comparação ao estudo propriamente dito, da coleta da matriz contaminada e preparação de amostra, até o término da análise. As amostras devem ser estocadas a uma temperatura de -20°C.

Novamente três amostras de baixa, média e alta concentrações devem ser analisadas e comparadas com aquelas obtidas da análise de amostras recém-preparadas.

Quanto à estabilidade da droga em soluções padrão, esta também deve ser analisada. Nesse caso o analito não está na presença de uma matriz biológica complexa, as soluções devem ser deixadas em repouso após preparação em temperatura ambiente por, no mínimo, seis horas. A análise das soluções-padrão em estoque por determinado tempo deve ser comparada com amostras preparadas e analisadas imediatamente e, serão consideradas estáveis, quando não se observar coeficientes de variação superiores a 15% do desvio padrão relativo para o valor obtido das amostras recentes, com exceção do LIQ, ao qual são aceitáveis desvios de até 20% (BRASIL, 2003).

2.7 Recuperação

Em estudos envolvendo bioanálises quantitativas, um ou mais compostos de interesse estão presentes em matrizes biológicas, seja ela, sangue, plasma, urina, líquido cefalorraquidiano ou outro. Devido à complexidade desses meios é necessário o desenvolvimento de uma metodologia para preparação da amostra a ser analisada em CLAE, a mesma necessita de algum tratamento antes de sua introdução no equipamento, para tanto deve ser idealmente límpida e isenta de partículas não solúveis. O composto de interesse deve ser recuperado através de um processo de extração, e geralmente essa etapa da metodologia pode ser a mais demorada, até se conseguir resultados satisfatórios (SNYDER, 1997).

Segundo a RDC 899 da ANVISA, a recuperação é a eficiência de extração de um método analítico, expressa através da relação percentual entre resultados analíticos de amostras em branco acrescidas de uma concentração conhecida do analito, submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos e soluções padrão não extraídas (BRASIL, 2003).

A avaliação do percentual de recuperação de um componente de uma amostra se dá através do procedimento de extração de amostras da matriz biológica previamente contaminadas com concentrações conhecidas do padrão analítico contra amostras da mesma matriz biológica extraídas e posteriormente contaminadas nas mesmas concentrações das amostras anteriores. Dessa forma, as amostras pós-contaminadas possuem uma concentração referente a 100% do analito e as outras amostras apresentarão recuperações relacionadas à amostra pós-concentrada.

2.7.1 Métodos de Extração e “clean-up” de Amostras

Em estudos analíticos tem-se como objetivo a obtenção de dados quantitativos e/ou qualitativos a respeito de um ou mais constituintes de uma amostra. A amostra pode ser de natureza sólida, líquida ou gasosa e, como requisitos de purificação necessários à análise, esta precisa passar por um procedimento com diversas etapas, até estar hábil para ser introduzida no equipamento cromatográfico (LANÇAS, 2009).

Matrizes biológicas complexas como sangue, plasma, urina, saliva e fluido cerebrospinal, além de tecidos, contêm grande quantidade de compostos endógenos que podem interferir na análise de moléculas pesquisadas e também presentes na amostra (GONÇALVES, 2005; BEDOR, 2007). O conhecimento das matrizes e das características físico-químicas do composto a ser quantificado, coordena o desenvolvimento da técnica de extração/recuperação utilizada para assegurar especificidade e seletividade ao método.

Em estudos pré-clínico e clínicos para definição de parâmetros farmacocinéticos, a matriz mais comumente utilizada é o plasma, e para quantificar nessa matriz, faz-se necessário um pré-tratamento das amostras. As razões para esse procedimento preparativo são inúmeras, destacando-se a própria complexidade da matriz, a existência de proteínas incompatíveis com a coluna e devido à concentração das substâncias analisadas estarem em concentrações muito baixas. (QUEIROZ et al, 2001).

O pré-tratamento das amostras tem a finalidade de eliminar os interferentes (“*Clean up*”), ou seja, extrair o fármaco solúvel no meio com altas percentagens específicas à detecção e, em determinadas ocasiões, pré-concentrar quando se faz necessário um aumento na sensibilidade do método (QUEIROZ & LANÇAS, 2005). O objetivo desse pré-tratamento é a obtenção de uma sub-fração da amostra original com as substâncias de interesse analítico, de modo que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ et al, 2001).

A metodologia de extração escolhida dependerá de diversos fatores, como as propriedades físico-químicas da molécula, entre elas o coeficiente de partição e o coeficiente de solubilidade, além da compatibilidade com o procedimento extrativo. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e concentração de compostos presentes em fluidos biológicos têm sido: precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida (BARRIONUEVO, 2001; ALNOUTI et al, 2005).

2.7.1.2 Extração Líquido-líquido (ELL)

A extração líquido-líquido (ELL) é um processo de separação que depende da propriedade de imiscibilidade de líquidos com partição entre as fases orgânica e aquosa dos componentes de uma amostra. A eficiência da extração está em função da afinidade dos solutos pelo solvente selecionado de extração, da razão das fases e do número de extrações (QUEIROZ et al, 2001).

A ELL como a maioria das técnicas, apresenta vantagens e desvantagens em seu emprego. Esta tem como vantagens ser uma técnica simples, de baixo custo e boa aplicabilidade em um amplo espectro de compostos, com extratos limpos, boas recuperações e boa reprodutibilidade. (QUEIROZ et al, 2001; NETO & NUNES, 2003).

Entre as desvantagens associadas à técnica, é possível listar: a pobre extração de alguns solutos polares, gasto excessivo de solventes na tentativa de recuperar a maior parte do composto, além disso, o arraste de impurezas da amostra que podem ser co-eluídas juntamente com o analito interferindo na eficiência da extração, exposição do analista e do meio-ambiente a um alto nível de resíduos tóxicos (QUEIROZ et al, 2001; LANÇAS, 2009).

2.7.1.3 Extração em Fase Sólida (EFS)

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. É uma das ferramentas de separação mais eficazes em CLAE para a extração de componentes presentes em sistemas complexos. A técnica representada na FIGURA 3, emprega sorventes empacotados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, com mecanismos de separação bem definidos (QUEIROZ et al, 2001; LANÇAS, 2004).

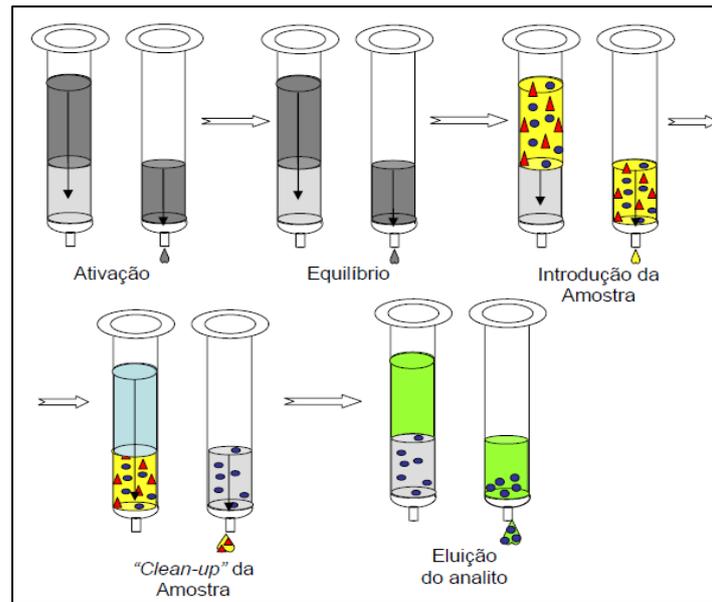


Figura 3. Esquema de extração em fase sólida demonstrando as diversas etapas envolvidas no processamento da amostra (BEDOR, 2007)

Como todas as técnicas de extração, a extração em fase sólida apresenta vantagens e desvantagens. Em relação à ELL a EFS apresenta as seguintes vantagens:

- Relativamente mais rápida;
- Recuperações relativas mais altas;
- Devido à fácil automatização, a EFS permite extrair dezenas de amostras simultaneamente (LANÇAS, 2009).
- Exatidão e precisão mais adequadas;
- Extratos mais limpos;
- Capacidade de processar de pequenos a grandes volumes de amostra em um único cartucho;
- Cartuchos e colunas de extração descartáveis;
- Não há formação de emulsões;
- Obtenção de uma elevada seletividade pela variedade de materiais sólidos empacotados e procedimentos de extração disponíveis (LINGEMAN & HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997).

A seleção do sorvente assim como em CL segue alguns critérios, selecionados em função de características empíricas a matriz em que está presente o analito, como solubilidade

em água *versus* solubilidade em solvente orgânico e forma iônica *versus* forma não iônica (SNYDER, 1997).

O desenvolvimento do método está relacionado com as propriedades dos analitos de interesse, a concentração dos compostos, a natureza da matriz, e o tipo de cromatografia e detecção envolvidos. Para estabelecer os parâmetros básicos é preciso também compreender as interações entre o analito, matriz e sorvente (HENNION, 1999).

2.7.1.4 Extração por Precipitação Protéica

A extração por precipitação é utilizada para o “*clean-up*” rápido e eficiente de alguns tipos de amostras. É uma técnica muito difundida no meio bioanalítico, principalmente na quantificação de uma ou mais drogas presentes em matrizes protéicas. A fundamentação da técnica é simples, pois visa à ruptura das interações moleculares formadas entre o fármaco e a proteína plasmática na presença de um agente precipitante, que pode ser um ácido, um sal, um solvente orgânico ou íons metálicos. Desta forma o sobrenadante pode ser segregado do precipitado e processado antes da análise por cromatografia (POLSON et al, 2003).

As diferentes técnicas conhecidas para precipitação de proteínas utilizam como agentes precipitantes certos tipos de solventes orgânicos, sais, ácidos e íons metálicos que atuam por mecanismos específicos sobre as proteínas. Na prática, solventes orgânicos são os precipitantes protéicos mais utilizados na análise de drogas. Sendo a acetonitrila, eleito o melhor solvente para desempenhar essa função. (POLSON et al, 2003).

Esse tipo de extração é considerado o mais rápido, de fácil aplicação em amostras biológicas e pode ser utilizado em uma ampla variedade de analitos (POLSON, *et al* 2003).

Solventes orgânicos com valor de constante dielétrica mais baixa que uma solução plasmática, aumenta a interação entre moléculas carregadas e facilitam interações eletrostáticas entre proteínas. O solvente orgânico desloca as moléculas de água ordenada ao redor das regiões hidrofóbicas na superfície das proteínas, além de minimizar também interações hidrofóbicas entre elas pela presença do solvente circundante, enquanto que interações eletrostáticas tornam-se predominantes e leva a agregação protéica.

Reagentes ácidos formam sais insolúveis com os resíduos amino carregados positivamente encontrados nas proteínas em pH abaixo do seu ponto isoelétrico. As proteínas são precipitadas a partir de soluções com altas concentrações de sal, e como os íons salinos se tornam hidratados, a água disponível nas superfícies hidrofóbicas das proteínas é sequestrada, o que por sua vez provoca a agregação das mesmas via interações hidrofóbicas proteína-

proteína e precipitação. A utilização direta de sais provoca um efeito semelhante a íons metálicos (POLSON, et al 2003).

O emprego de íons metálicos carregados positivamente reduz a solubilidade das proteínas, alterando o seu ponto isoelétrico. Em solução plasmática, íons metálicos competem com prótons por sítios de ligação disponíveis nos resíduos de aminoácido expostos, formando ligações mais fortes e deslocando esses prótons dos sítios, resultando numa diminuição do pH da solução. O ambiente formado pela mudança do ponto isoelétrico das proteínas e a redução do pH geralmente sucede à precipitação protéica (POLSON, *et al* 2003).

Um estudo realizado por POLSON e colaboradores (2003), avaliou vários agentes precipitantes de proteínas para análise em CLAE-EM/EM em plasma. Plasmas de diversas espécies animal (cão, gato, rato e humano) foram incluídos no estudo para verificar a variabilidade e a extensão das precipitações. Os agentes precipitantes no estudo foram: ácido tricloroacético e ácido m-fosfórico (ácidos), sulfato de zinco (íon metálico), acetonitrila, metanol e etanol (solventes orgânicos), sulfato de amônio e cloreto de alumínio (sais). Verificou-se, contudo que, com exceção do sulfato de amônio e cloreto de alumínio, todos os precipitantes foram no mínimo 90% eficazes como precipitantes plasmáticos numa razão de 2:1. De modo geral a eficácia dos precipitantes aumentaram com o volume numa relação aproximada de 2 ou 2,5 para 1. A acetonitrila, o ácido tricloroacético e o sulfato de zinco foram os agentes mais eficientes com uma taxa de precipitação superior a 96% na proporção de 2:1, exceto o valor da precipitação para o plasma humano com o ácido, da ordem de 91%.

Embora a precipitação protéica seja um procedimento prático e rápido de se executar, o mesmo apresenta muitas variáveis em relação a uma boa recuperação do analito em matriz biológica, já que a existência de características físico-químicas inerentes a cada molécula, pode diferenciar pronunciadamente a recuperação de moléculas diferentes, ou também a co-extração de outros componentes (O'CONNOR *et al*, 2002;).

2.9 Tiazolidinedionas e Novas perspectivas de Tratamento para a Inflamação

Nos anos 1990 os inibidores seletivos da COX -2 se tornaram os medicamentos mais utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que, até aquele momento acreditava-se que apresentavam efeitos colaterais menos significativos. Contudo, as expectativas sob esta classe de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) foi bastante questionada, quando estudos demonstraram os riscos cardiovasculares provocados por esses medicamentos (BARREIRO, et al 2002; ARAÚJO, et al., 2005).

Os anti-inflamatórios se dividem em diversos grupos, entre eles, os principais são os não esteroides (AINES), esteroides, anti-histamínicos e anti-leucotrienos, que atuam em diferentes vias envolvidos na cascata inflamatória.

Atualmente, as estratégias de tratamento para doenças inflamatórias envolvem principalmente a interrupção da síntese ou ação de mediadores críticos que provocam a resposta à lesão, promovendo modificações estruturais, baseada na existência de receptores específicos, com conformação espacial particular capaz de desencadear os processos que conduzem à resposta biológica (GAYATHRI et al., 2007; SANTOS, 2009).

Nos últimos vinte anos, foi identificado um alvo biológico capaz de mediar uma atividade anti-inflamatória quando ativado por um agonista específico, o alvo conhecido como receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR), fator transcricional pertencente a uma superfamília de receptores nucleares, que foi inicialmente identificado como essencial ao metabolismo da glicose (DESERGNE et al., 2006; SANTOS, 2009).

Os PPARs funcionam vinculados a ligantes específicos, sejam eles de natureza endógena (ácidos graxos insaturados, PGJ2, LTB4) ou sintética (TZD, fibratos e AINEs). Assim, ao interagir com seu ligante, mantendo parceria com o receptor de ácido retinóico (RXR), o receptor é ativado, promovendo a atividade de genes alvo em suas regiões promotoras. Estudos atestam uma importante função dos PPARs na regulação do metabolismo energético e da diferenciação celular. Estudos subsequentes a estes vêm identificando uma possível função dos PPARs no controle da inflamação. A maioria das investigações publicada sobre estes receptores tem sido realizada a partir da descoberta de agonistas sintéticos dos mesmos, incluindo os estudos com as tiazolidinonas relacionados com seus efeitos sensibilizadores da insulina (SHULMAN E MANGELSDORF, 2005; GLASS, 2006) IANE PAG 37

Foram evidenciados até o momento três isoformas de PPARs: PPAR α , PPAR δ/β e PPAR γ . A isoforma PPAR γ foi inicialmente identificada como essencial no metabolismo da glicose e é expressa principalmente em tecidos adiposos, nos quais desempenha um papel importante também no metabolismo lipídico (FERRE, 2004; LINFORD et al., 2007).

Pesquisas mais recentes exploram as atividades dos PPARs como reguladores de respostas inflamatórias e imunes, impulsionando o surgimento de uma novos compostos para o desenvolvimento de medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (YANG et al, 2000).

Nesse contexto, agonistas sintéticos da subclasse PPAR γ , chamados tiazolidinonas (TZDs), são usados na terapia do diabetes tipo 2, como sensibilizadores da insulina (YKI-

JARVINEN, 2004), contudo, a eficácia desses fármacos não se restringe apenas a essa propriedade terapêutica, pois possuem também propriedades anti-inflamatórias, que têm sido caracterizadas em células do sistema imune, como linfócitos B e T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e granulócitos (APPEL et al, 2005; LI, PASCUAL e GLASS, 2000; RICOTE et al, 1998; BRUNE e VON-KNETHEN, 2003; WANG et al, 2001; YANG et al, 2000). Dessa maneira, diversos tipos de células são potenciais alvos para os efeitos anti-inflamatórios de ligantes PPAR γ .

As TZDs foram originalmente desenvolvidas por screening de análogos do ácido clofíbrico, um antioxidante, no início de 1980, no Japão (KAWMATSU et al., 1980; YOSHIOKA et al., 1989. Tais compostos tiazolidínicos possuem uma estrutura química comum, o núcleo tiazolidina-2,4-diona.

Alguns fármacos desse grupo exercem efeitos hipoglicêmicos e foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do diabetes tipo 2. Sua atividade farmacológica se dá através da ligação ao PPAR, regulando a expressão de genes envolvidos na sensibilização à ação da insulina (ALLAHTAVAKOLI et al., 2006). Em 1997, a FDA aprovou a Troglitazona, que logo depois, em março de 2000, foi recolhida do mercado por provocar sérios efeitos colaterais. No entanto, mesmo com o insucesso inicial, outras TZDs foram seguidamente aprovadas pelo FDA: o maleato de rosiglitazona (Avandia $\text{\textcircled{R}}$) e o cloridrato de pioglitazona (Actos $\text{\textcircled{R}}$), que estão disponíveis no mercado norte americano, japonês, europeu e brasileiro (SALTIEL & OLEFSKY, 1996).

Outros estudos confirmam o potencial anti-inflamatório das TZDs quando interagem com alta afinidade com o PPAR γ , resultando na inibição da expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e das moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1)-processos iniciais da gênese da inflamação vascular; inibição da enzima metaloproteinase, envolvida na ruptura da placa aterosclerótica, efeito modulador do gene do PAI-1, e potente efeito estimulador sobre a secreção da adiponectina, parece também ter um efeito direto sobre a função vascular, estimulando a produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, melhorando a função endotelial (RE et al., 1999; LIU et al., 2005; CHEN, 2003).

Todas as limitações relacionadas a essa classe de fármacos, aumentaram o interesse de pesquisadores pela identificação de novos ligantes de que mantenham os efeitos anti-inflamatórios benéficos da ativação do receptor, sem, no entanto, desencadear efeitos desfavoráveis clássicos às TZDs. Postula-se que a ativação parcial e específica do PPAR, assim como a sua modulação diferencial em tecidos distintos, possa ser mais segura e efetiva que a ativação completa e não seletiva (CHEN, 2003).

Nesse cenário a síntese de novas moléculas tiazolidinônicas, tendo a inflamação como alvo terapêutico, fez surgir diversos compostos heterocíclicos com propriedades anti-inflamatórias representando uma expectativa positiva para terapias mais eficazes que as convencionais. Pesquisas realizadas no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/GPIT/UFPE) também avaliaram o potencial anti-inflamatório de algumas tiazolidinas substituídas nas posições 3 e 5.

Em 2008, novos compostos tiazolidinônicos foram sintetizados e avaliados por SILVA e colaboradores. A série 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-dionas compreendendo sete compostos (LPSF/GQ 57, 59, 60, 61, 64, 93 e 113B) teve a sua atividade anti-inflamatória testada em camundongos através do modelo do air-pouch inflamatório (SILVA, 2008).

Entre uma gama de derivados tiazolidínicos sintetizados pelo LPSF com atividade anti-inflamatória confirmada, elegeu-se o LPSF/GQ-113B para realização de ensaios metodológicos com o intuito de tornar possível a quantificação da droga em plasma animal, servindo como a etapa de um projeto inicial para delineamento de estudos farmacocinéticos da droga como, por exemplo, as particularidades da sua absorção, distribuição, metabolização e excreção. A rota sintética do LPSF/GQ-113B está descrita na FIGURA 4.

Reconhecendo o potencial desse composto, decidiu-se desenvolver um trabalho analítico através do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, coordenado pela professora doutora Maria Bernadete de Sousa Maia, com o objetivo de desenvolver e validar uma metodologia analítica quantitativa para doseamento do referido fármaco em plasma de ratos Wistar, galgando atribuições ao composto na cadeia de experimentos que fazem parte de etapas sequenciais e interdependentes para o desenvolvimento de um composto candidato a novo fármaco.

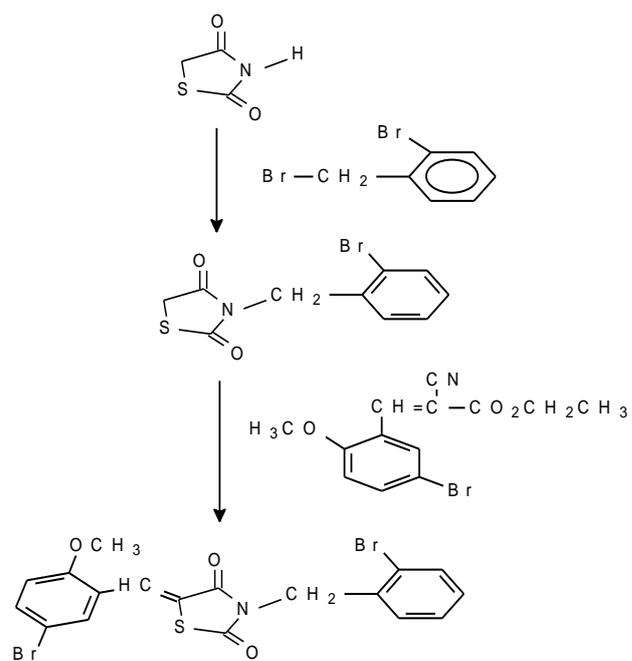


Figura 4. Representação esquemática resumida da rota sintética do LPSF/GQ-113B

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectroscopia ultravioleta (CLAE-UV) para determinação quantitativa do derivado (3-(2-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) (LPSF/GQ-113B) em plasma de ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1-Determinar as características físico-químicas do composto LPSF/GQ-113B experimentalmente e a partir de dados gerados por bancos de dados com a finalidade de agregar informações necessárias para determinação das condições cromatográficas ideais para o método.

3.2.2 - Determinar as condições cromatográficas ideais para determinação do LPSF/GQ-113B (tipo de coluna, fluxo, influência da matriz biológica, método de extração, etc) - Etapa de pré-validação do método.

3.2.2 - Determinar estabilidade do LPSF/GQ-113B no plasma de ratos Wistar, bem como no solvente utilizado na preparação da solução de trabalho a ser empregada - Etapa de pré-validação e validação do método.

3.2.3 – Determinar seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação do método desenvolvido - Etapa de Validação do método.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 O Composto LPSF/GQ-113B

O composto (3-(2-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) (LPSF/GQ-113B) foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos que faz parte do Grupo de Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.2 Equipamento

Cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10AD SHIMADZU acoplado a um detector UV-fixo SPD-10, equipado por um par de bombas pneumáticas em paralelo e um injetor manual com capacidade para volume injetado de 20 μ L.

4.1.3 Coluna cromatográfica

Coluna C₁₈, 150mm x 4,6mm (comprimento x diâmetro interno) x 5 μ m tamanho de partícula) Phenomenex[®]

4.1.4 Solventes

A acetonitrila e o metanol grau HPLC (CARLO HERBA reagents[®]), foram adquiridos por intermédio da Urq Labor Comércio. A água ultrapura para análise foi fornecida pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.5 Matriz biológica (plasma)

O plasma foi obtido a partir de ratos Wistar de grupos controle negativo (livre de tratamento com qualquer substância), disponibilizados por diversos laboratórios do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA, tendo sido aprovado pelo Comitê de ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o nº de protocolo 23076.024803/2009-18.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do Plasma a Partir de Ratos Wistar

Antes do início das atividades com animais selecionados, o atual projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) em animais da Universidade Federal de Pernambuco.

Todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com os anestésicos quetamina (100mg/ml) e xilazina (20mg/ml) nas concentrações de 75 mg/kg e 15mg/kg respectivamente. Após isso, cada animal foi deixado em repouso até apresentar sinais de letargia.

A punção, foi então realizada no coração, coletando-se assim o sangue, que foi transferido para um tubo contendo o anticoagulante (EDTA) e imediatamente submetido à centrifugação (7000 rpm) para separação dos componentes sanguíneos e obtenção do plasma. O plasma obtido foi acondicionado em tubos de polipropileno e congelado a -20°C para posterior utilização.

4.2.2 Determinação das Características Físico-químicas do LPSF/GQ-113B

A obtenção de alguns valores para as características físico-químicas do LPSF/GQ 113-B foram viabilizadas pelo software Virtual Computational Chemistry Laboratory

(VCCLAB), que disponibiliza um programa gratuito para a análise de compostos, tendo como base para gerar resultados, uma biblioteca com dados de milhares de compostos (<http://www.vcclab.org>, 2005).

Os testes de solubilidade compreenderam a tentativa de diluição de 0.5 mg e 1.0 mg da substância em um volume de 1.0 mL de cada solvente orgânico, sendo consideradas solúveis àquelas nas quais houvesse total solubilização do composto.

4.2.3 Obtenção do Espectro de Varredura na Região do UV-Vis do LPSF/GQ-113B

Uma das primeiras etapas no desenvolvimento do método consiste na obtenção do espectro de varredura na região ultravioleta-visível (UV-Vis) do LPSF/GQ-113B para obtenção do melhor comprimento de onda, o mais absorvido pelo composto, a ser usado na quantificação do mesmo por CLAE acoplado ao detector UV.

Comumente a varredura UV-Vis é realizada por um espectrofotômetro, porém com a disponibilidade de um detector por arranjo de diodos (DAD) acoplado a um cromatógrafo líquido, foi possível elucidar em quais comprimentos de onda o composto mais absorvia durante a corrida analítica.

4.2.4 Seleção da Fase Estacionária mais Adequada

O LPSF/GQ-113B apresentou um valor médio para $\log P = 4,90 (\pm 0,61)$ o que demonstra sua natureza apolar. A partir desse dado e levando em consideração a versatilidade de certas colunas em CLAE em fase reversa, definiu-se como fase estacionária mais adequada a C_{18} (octadecilsilano), com a seguinte configuração:

- Comprimento da coluna = 15 cm;
- Tamanho de partícula = 5 μm ;
- Diâmetro interno da coluna = 4,6 mm
- Material empacotado: sílica quimicamente ligada ao octadecilsilano (C_{18})

Os outros parâmetros da coluna são classicamente os mais utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência, pois garantem uma separação eficiente com reprodutibilidade e quantificações exatas e precisas.

4.2.5 Confirmação da Identidade do Composto Através da Massa Molecular Utilizando um Espectrômetro de Massas

O composto foi solubilizado completamente em ACN e foi submetido à análise em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Ion-trap Time of flight da Shimadzu (LC-MS-IT-TOF), capaz de determinar a massa do íon molecular e de seus fragmentos formados, sendo assim capaz de determinar a massa do composto.

4.2.6 Modo Isocrático e Modo por Gradiente

Optou-se pela eluição isocrática devido à facilidade em separar os componentes da amostra, já que todos os compostos plasmáticos detectáveis por UV eluíram em menos de três minutos e o analito de interesse eluiu em cinco minutos, sendo assim, não houve necessidade de separações mais complexas por gradiente.

4.2.7 Análise de cromatogramas de amostras de plasma branco

Para definir o perfil de detecção de uma amostra de plasma em branco (sem a presença de nenhum componente exógeno), uma solução foi preparada a partir de um método extrativo por precipitação protéica. Após a definição do método extrativo, descrito no tópico resultados, foi possível analisar o perfil cromatográfico de amostras do plasma branco pela injeção direta da solução sobrenadante no sistema cromatográfico após o final do processo.

O sobrenadante nessas condições foi injetado diretamente no sistema CLAE-UV sob um comprimento de onda selecionado em 254 nm no detector, mesmo comprimento de onda utilizado na análise do LPSF/GQ-113B, já que o mesmo tem absorção máxima em comprimentos de onda de 229 a 279nm; fluxo de 1 mL/min e uma fase móvel formada pela mistura de ACN:água:ácido acético 85:15:1 v/v/v.

Sabendo-se então do perfil de componentes detectáveis do plasma e de seus respectivos tempos de retenção, fez-se necessário selecionar uma fase móvel capaz de manter o tempo de retenção do LPSF/GQ-113B fora dessa faixa, ou seja, que o tempo de retenção seja superior a três minutos.

4.2.8 Testes para obtenção da fase móvel mais adequada

Levando em consideração a natureza apolar da molécula pesquisada, foram realizados diversos testes combinando solventes em proporções diferentes, até alcançar uma fase móvel que oferecesse condições ideais para a eluição do composto. Misturas de acetonitrila (ACN) e água e metanol (MeOH) e água, com ou sem a adição de agentes tamponantes ou acidificantes foram preparadas .

As proporções definidas entre os solventes foram: para a mistura MeOH:água (40: 60, 65:35 e 85:15 v/v). As proporções para a mistura ACN:água respeitaram as mesmas proporções, (40: 60, 65:35 e 85:15 v/v). Como agentes modificadores do pH. foram utilizados 1% de ácido acético como agente acidificante e o fosfato de amônio 30 mMol como agente basificante. Tais agentes foram adicionados com intuito de alterar o estado de ionização da droga para verificação das possíveis modificações no tempo de retenção da mesma, e dessa forma eleger a fase móvel que proporcionasse resultados reprodutíveis com menor tempo de retenção, sem influência de matriz e sem possibilidade de co-eluição com os componentes do plasma extraídos conjuntamente com o analito na etapa de recuperação do estudo.

Os resultados puderam ser visualizados a partir dos cromatogramas gerados em cada análise. Soluções-padrão aquosas em triplicata foram preparadas nas concentrações referentes aos controles de qualidade (CQB, CQM E CQA) 1500, 7500 e 13000 ng/mL respectivamente, e estão listados no capítulo de resultados.

4.2.9 Definição de outros parâmetros cromatográficos (fluxo e temperatura)

O fluxo adequado para a fase móvel e a temperatura da coluna foram determinadas a partir de testes com a variação desses parâmetros. Para cada fluxo testado, amostras em triplicata da concentração referente ao CQB (1500 ng/mL) foram utilizadas para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

A avaliação do melhor fluxo para a fase móvel definida determinada a partir da viabilidade da análise em relação ao gasto de solvente e o tempo de eluição do LPSF/GQ-113B. Foram testadas as seguintes vazões em triplicata:

- 0.5 mL/min;
- 0.8 mL/min;
- 1.0 mL/min;
- 1.2 mL/min.

A definição da temperatura do forno, onde fica acondicionada a coluna, foi delineada a partir da análise dos tempos de retenção do analito nos cromatogramas. Para cada fluxo testado amostras em triplicata da concentração referente ao CQB (1500 ng/mL) foram utilizadas para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Foram analisadas as seguintes temperaturas:

- 25 °C;
- 30° C;
- 40° C.

4.2.10 Testes de estabilidade

Os testes de estabilidade das soluções plasmáticas e das soluções trabalho do LPSF/GQ 113-B seguiram as normas estabelecidas segundo (BRASIL, 2003).

O estudo de estabilidade compreendeu quatro etapas: estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade das soluções-padrão.

Após a submissão das soluções plasmáticas a períodos de armazenamento, as mesmas foram coletadas e submetidas ao processo extrativo pré-definido antes da análise.

O estudo de curta duração compreendeu a preparação de três amostras em quintuplicata referentes aos controles de qualidade e deixadas em repouso por um período de 10h. Antecedendo o período de análise dessas amostras uma curva de calibração foi preparada para verificar a manutenção da linearidade do método. As amostras submetidas ao estudo de curta duração após analisadas foram comparadas com outras amostras em mesmo número e nas mesmas concentrações, porém, preparadas recentemente. A comparação entre amostras preparadas 10h antes e amostras recentes fornecem informações sobre a possível degradação e diminuição da concentração da solução do analito em processamento.

Para o estudo de longa duração foi definido um período de repouso para as amostras de 24h e seguiu-se o mesmo protocolo descrito acima para a estabilidade de curta duração, porém o acondicionamento das amostras nesse estudo ocorreu em *freezer* a uma temperatura de -20°C .

O estudo de estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento, com amostras estocadas a -20°C . Seguiu um esquema de armazenamento em períodos de 24h em baixas temperaturas, com períodos de cerca de 1h em temperatura ambiente, até a amostra descongelar e atingir a temperatura ambiente, seguindo repetidamente três ciclos (24h/1h/24h/1h/24h/1h análise). Após o terceiro ciclo as amostras foram novamente descongeladas, extraídas e analisadas.

O quarto estudo de estabilidade compreendeu a análise de soluções-padrão aquosas nas concentrações referentes aos CQB, CQM E CQA após 10 h de armazenamento, seguindo o método descrito, uma nova curva de calibração foi preparada e às soluções em repouso, comparadas com soluções-padrão preparadas recentemente e analisadas.

4.2.11 Limite inferior de detecção e Limite inferior de quantificação

O Limite inferior de detecção (LID) e o Limite inferior de quantificação (LIQ) do método foram determinados através de diluições sucessivas até os supostos LIQs (determinação pela relação sinal/ruído maior que três unidades) e LD (determinado pela relação sinal/ruído maior que 10 unidades), em quintuplicata. Concentrações decrescentes foram analisadas, até que o sinal ruído indicado acima para cada limite fosse alcançado.

O software utilizado (LC Solutions- Shimadzu Japão) permitiu que a relação sinal ruído fosse determinada automaticamente. Dessa forma, as relações selecionadas para o LID e o LIQ de acordo com Brasil (2003).

4.2.12 Amostras de controle de qualidade

Após a definição dos LD e LQ foi possível propor as concentrações para a confecção da curva de calibração. Sendo o valor para o LQ de 500 ng/mL, utilizou-se esse ponto como concentração inferior da curva de calibração.

Foram definidos sete pontos para a elaboração da curva de calibração (faixa de concentrações definida pelo ponto inferior e ponto superior, visando em um posterior estudo farmacocinético, abranger amostras de plasma animal contaminadas nessas concentrações). Cada concentração referente aos pontos da curva foi preparado adicionando-se a mesma matriz biológica do método já descrito, quantidades apropriadas do analito para a preparação de soluções plasmáticas nas seguintes concentrações: 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL. A partir disso, foi possível calcular o teor das soluções de controle de qualidade em concentrações baixa, média e alta (CQB, CQM, CQA), estimadas segundo a RDC 899/03 da ANVISA/Ministério da Saúde, segundo a descrição abaixo.

A partir disto os valores para as soluções de controle de qualidade foram definidos em (LIQ = 500 ng/mL), (CQB = 1500 ng/mL), (CQM = 7500 ng/mL) e (CQA = 13000 ng/mL).

4.2.13 Preparação das soluções mãe e soluções de trabalho

A solução mãe foi obtida a partir da diluição do LPSF/GQ-113B em acetonitrila numa concentração de 500 µg/mL. A partir da solução mãe, por diluições consecutivas as soluções de trabalho foram preparadas em concentrações 10 vezes superiores àquelas necessárias para a contaminação do plasma branco, permitindo que concentrações exatas fossem retiradas em pequenos volumes e adicionadas a alíquotas de plasma. As soluções

de trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações 5000, 10000, 20000, 40000, 60000, 80000 e 160000 ng/mL.

4.2.14 Contaminação de amostras de plasma branco com o LPSF/GQ-113B

No procedimento de preparação da amostra, o passo inicial consiste em contaminar uma amostra de plasma branco com uma concentração conhecida do composto a ser quantificado. Essa etapa foi cuidadosamente elaborada, para que não houvesse erros de transferência de massas no ajuste das concentrações.

A partir de sete tubos contendo soluções de trabalho nas concentrações 5000, 10000, 20000, 40000, 60000, 80000 e 160000 ng/ml foram retiradas de cada uma, concentrações correspondentes a 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL contidas em um volume de 100µl, em seguida transferidas com auxílio de uma micropipeta calibrada para outros sete tubos, contendo previamente um volume de 900 µL. Obtendo soluções plasmáticas nas concentrações de 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 ng/mL.

4.2.15 Extração do LPSF/GQ-113B

A precipitação protéica foi testada como procedimento extrativo inicial no desenvolvimento do método, devido as suas vantagens descritas anteriormente, tais como praticidade, baixo custo e alta reprodutibilidade. Porém tais vantagens poderiam não ser suficientemente favoráveis caso a porcentagem de recuperação do analito fosse insignificante.

Um número suficiente de soluções plasmáticas contaminadas com concentrações conhecidas do LPSF/GQ-113B foi preparado para obtenção de quatro grupos de amostras contendo em cada um três concentrações em quintuplicatas, referentes às concentrações do CQB, CQM e CQA.

A cada grupo foi testado um método de precipitação para verificação do percentual de recuperação:

1. Acetonitrila, água 2:1 v/v

2. Acetonitrila, água 3:1 v/v

3. Metanol, água 2:1 v/v

4. Metanol, água 3:1 v/v

Às amostras de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de LPSF/GQ-113B (100 µL), foi adicionado um volume correspondente a 300µl do agente precipitante e, imediatamente foi observada turvação das soluções, devido às reações de desnaturação protéica. Nessa reação as ligações formadas entre o composto adicionado na etapa anterior e as proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, são desfeitas e a droga fica novamente livre em solução. A adição do agente precipitante visou à recuperação da droga na solução sobrenadante formada no final do processamento.

Para verificação do percentual de recuperação, compararam-se as áreas dos picos obtidos de soluções padrão do LPSF/GQ-113B com 100% do fármaco presente, com as áreas dos picos obtidos com amostras extraídas de plasma contaminadas com o LPSF/GQ-113B nas mesmas concentrações que o outro grupo de amostras.

A diferença desse procedimento encontra-se na inversão de etapas. Primeiramente uma alíquota de 100 µL de plasma branco foi misturada com 200 µL de ACN, após agitação e centrifugação, todo o sobrenadante foi vertido para outro tubo, ao qual é adicionado um volume de 100 µL de solução trabalho em ACN nas mesmas concentrações correspondentes ao processo extrativo descrito acima, o volume final da solução é igual ao volume das soluções submetidas à comparação.

A confiabilidade do método extrativo foi demonstrada por análises de cada CQ em quintuplicata, as quais demonstraram exatidão e precisão.

Após nova agitação, as soluções continham os componentes extraídos do plasma e uma concentração conhecida do analito de interesse, pois este foi adicionado após a precipitação e então pôde ser padrão de comparação frente às amostras extraídas de modo convencional.

Recuperação % = (Área média das soluções extraída/Área média das soluções-padrão extraídas) x 100

Outros métodos extrativos não foram experimentados, pois a extração por precipitação protéica forneceu recuperações altas e reprodutíveis, não havendo a necessidade de outros testes.

4.2.16 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir de injeções de soluções aquosas de calibração do LPSF/GQ-113B, soluções extraídas do plasma branco, e soluções extraídas a partir de alíquotas de plasma contaminados com as mesmas concentrações das soluções padrão.

A comparação entre os cromatogramas resultantes da análise das soluções permitiu concluir que as substâncias detectáveis do plasma em CLAE-UV são eluídas totalmente através da fase estacionária num tempo aproximado de três minutos, não havendo nenhum outro sinal referente ao plasma branco.

A comparação direta entre as duas soluções-padrão permite concluir se as áreas referentes ao pico da LPSF/GQ-113B em ambos cromatogramas sofrem alguma influência de matriz. Nesse caso as áreas podem não sofrer nenhuma alteração, evidenciando nesse caso a inexistência do efeito de matriz, terem suas áreas aumentadas ou ainda diminuídas pela ação dos componentes matriciais.

4.2.17 Preparação da Curva de Calibração

Foi elaborada uma curva de calibração abrangendo sete pontos correspondentes a alíquotas de soluções plasmáticas contaminadas com concentrações conhecidas do LPSF/GQ 113B em quintuplicata. Nesse momento do estudo os parâmetros cromatográficos (fase móvel, fase estacionária, fluxo e temperatura do forno) já haviam sido definidos.

As concentrações foram fixadas em 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL. Os pontos definidos para a curva de calibração de 500 a 16000 ng/mL foram definidos de acordo com uma faixa crescente de concentrações, sem a necessidade de inserir concentrações muito altas, que estariam fora da realidade de análise. Todas as amostras, antes de serem analisadas em CLAE-UV foram submetidas à técnica de extração completa, definida previamente.

4.2.18 Linearidade

Os critérios para a etapa da linearidade foram decididos inicialmente antes das análises em CLAE-UV de acordo com (BRASIL, 2003), segundo as normas técnicas para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, os critérios de aceitação para as curvas de calibração estão descritas abaixo:

- O menor ponto da curva (LQ) deve ter desvio $\leq 20\%$ da concentração nominal declarada;
- Outros padrões (CQB, CQM, CQA) devem ter desvio $\leq 15\%$ da concentração nominal declarada;
- O coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou maior a 0,98.

Nesse contexto, o estudo da linearidade foi planejado através de análises intra-dia e inter-dias. Sendo cada curva preparada a partir de soluções mãe distintas, afim de reduzir as tendências de erro.

As análises intra-dia corresponderam à confecção de três curvas de calibração no mesmo dia, utilizando o mesmo equipamento com um intervalo de 2h entre cada corrida cromatográfica nas concentrações descritas. As análises inter-dias seguiram também a confecção de três curvas de calibração em dias diferentes, utilizando o mesmo equipamento. O intervalo entre o fim de uma corrida e o início de outra foi de 24h.

4.2.19 Precisão intra e inter-dias

A etapa referente à precisão foi realizada em dois momentos, a precisão intra-dia e a precisão inter-dias. Juntamente a cada corrida foi preparada uma curva de calibração com o objetivo de verificar a manutenção da linearidade do método. Cada corrida compreendeu quatro concentrações a serem analisadas (LIQ, CQB, CQM E CQA) em quintuplicata.

A precisão intra-dia correspondeu a três corridas no mesmo dia e no mesmo laboratório, com um intervalo de 3h antes do término de uma e o início de outra, para que se houvesse tempo de construir uma nova curva de calibração e estabilizar o sistema.

A precisão inter-dias foi realizada em três dias diferentes com o intervalo de 24h entre o término de uma corrida e o início de outra. Para cada dia de análise foi elaborada uma curva de calibração com o mesmo intuito da curva construída no ensaio intra-dia.

Para saber se o método desenvolvido era preciso nos dois momentos, foi verificado se o grau de repetibilidade entre os valores para as áreas dos sinais detectados de um mesmo grupo de amostras estavam dentro dos valores permitidos de acordo com (BRASIL, 2003).

4.2.20 Exatidão intra e inter-dias

Através do estudo de exatidão verificou-se se o conjunto de amostras analisadas nas mesmas concentrações estavam dentro dos limites semelhantes às concentrações conhecidas injetadas.

Essa etapa também foi realizada por exatidão intra-dia e inter dias. A exatidão inter-dias foi realizada em três dias diferentes com um intervalo de 24h entre o término de uma corrida e o início de outra. Para cada dia de análise foi elaborada uma curva de calibração.

A exatidão intra-dia correspondeu a três corridas no mesmo dia e no mesmo laboratório, com um intervalo de 3h antes do término de um a e o início de outra, para que se houvesse tempo de construir uma nova curva de calibração e estabilizar o sistema.

O desvio entre os valores obtidos para o conjunto em quintuplicata de amostras de cada concentração não deve exceder 15% para as amostras referentes aos CQB, CQM e CQA, para as amostras referentes ao LIQ, admite-se desvios menores ou iguais a 20%.

5 RESULTADOS

5.1 Características físico-químicas do composto LPSF/GQ-113B

A molécula LPSF/GQ-113B foi submetida à análise do software VCCLAB (<http://www.vcclab.org>, 2005), que forneceu os seguintes valores para as características físico-química: peso molecular = 480,8983; logP = 4.90 (\pm 0.61); logS = -5.61(\pm 0.36); pKa = não disponível.

Outros preditores físico-químicos disponíveis on-line foram acessados, e os mesmos, não identificaram valores para o pKa da substância, no entanto os outros aspectos citados acima tiveram resultados semelhantes aos coletados no VCCLAB.

5.2 Solubilidade do composto LPSF/GQ-113B

A avaliação da solubilidade do fármaco, demonstrou maior capacidade do composto em se solubilizar na presença da acetonitrila, o que representou um importante dado no momento de escolha da fase móvel e do agente precipitante.

5.3 Espectro de varredura na região do UV-Vis da droga

O composto LPSF/GQ-113B apresenta em sua estrutura molecular dois grupamentos cromóforos, indicados pelos dois círculos vermelhos na FIGURA 5, o que confere sua detectabilidade por um detector ultravioleta.

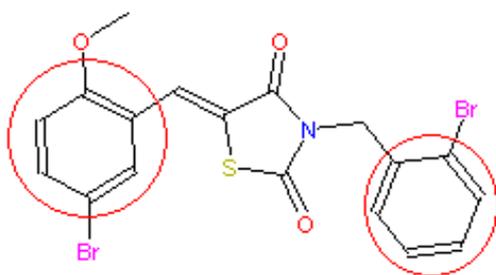


Figura 5. Estrutura molecular do composto LPSF/GQ-113B, com seus dois anéis aromáticos destacados.

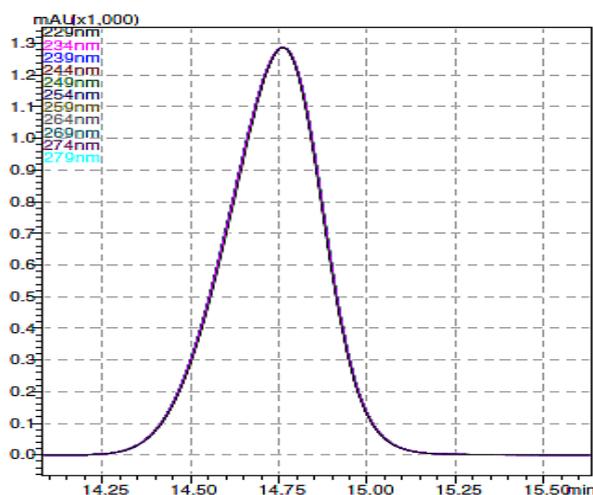


Figura 6. Regiões do UV compreendidas entre 229-279 nm, onde ocorre absorção máxima do LPSF/GQ-113B.

As regiões do UV compreendidas entre 229 e 279nm demonstram um perfil de máxima absorção para o LPSF/GQ-113B, podendo qualquer comprimento de onda deste ser utilizado para a quantificação no detector UV acoplado ao CLAE. Para tanto o valor médio de 254nm foi escolhido para tal necessidade. O espectro de absorção UV do LPSF/GQ-113B representado na FIGURA 6, foi analisado a partir de um detector UV por arranjo de diodos (DAD) que permitiu por varredura avaliar a absorbância do composto em diversos comprimentos de onda dentro da faixa UV.

5.4 Confirmações da identidade do composto por espectrometria de massas

Amostras do composto LPSF/GQ113-B foram preparadas numa concentração de 300 ng/mL em ACN e analisadas em LC-EM após injeção e posterior identificação molecular. Após algumas injeções a molécula teve sua identidade confirmada, com massa molecular somada a uma molécula de acetonitrila, opção de análise fornecida pelo programa. Com o auxílio do Ion-trap foi capaz de se isolar o sinal de interesse com alta resolução, descartando outros resíduos não identificados detectados em baixíssimas concentrações.

A massa molecular do LPSF/GQ113-B é 480,5409 enquanto a massa da acetonitrila é 41,05. A soma das suas massas resulta em um valor de 521.5909, a análise no modo negativo adiciona a massa de mais um próton, resultando no valor final da massa igual a 522.5909, como é mostrado no histograma representado na FIGURA 7.

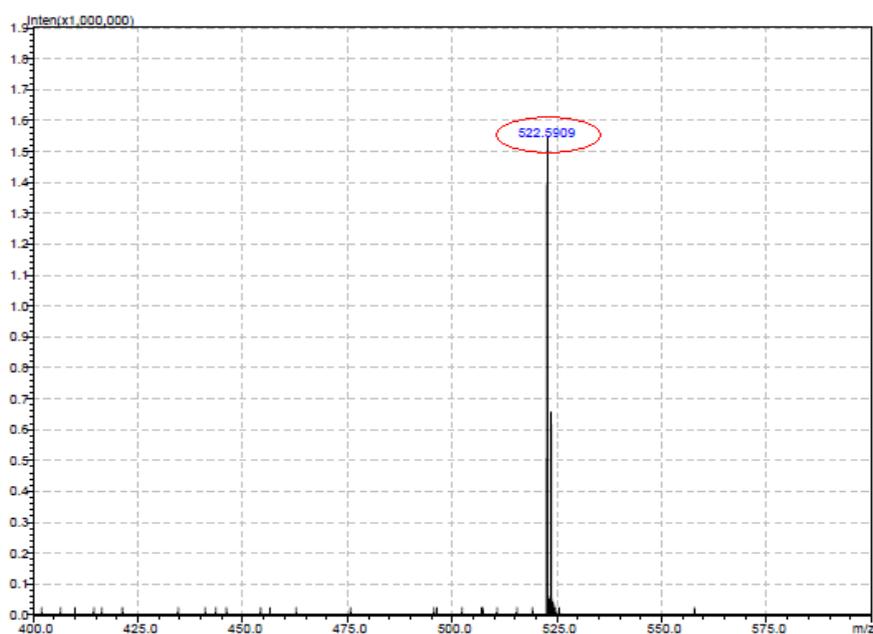


Figura 7. Espectrômetro de massas do composto LPSF/GQ-113B no modo negativo com aduto de uma molécula de acetonitrila, massa de 522.5909.

5.5 Delineamento da fase móvel ideal

A mistura de acetonitrila com água e ácido acético numa proporção de 85:14:1 v/v/v compoendo uma fase móvel (pH 6,0), foi usada para a eluição das soluções-padrão aquosas do LPSF/GQ-113B nas concentrações dos controle de qualidade, geraram sinais com o tempo de retenção igual a **5,14 min.** mostrados na FIGURA 8

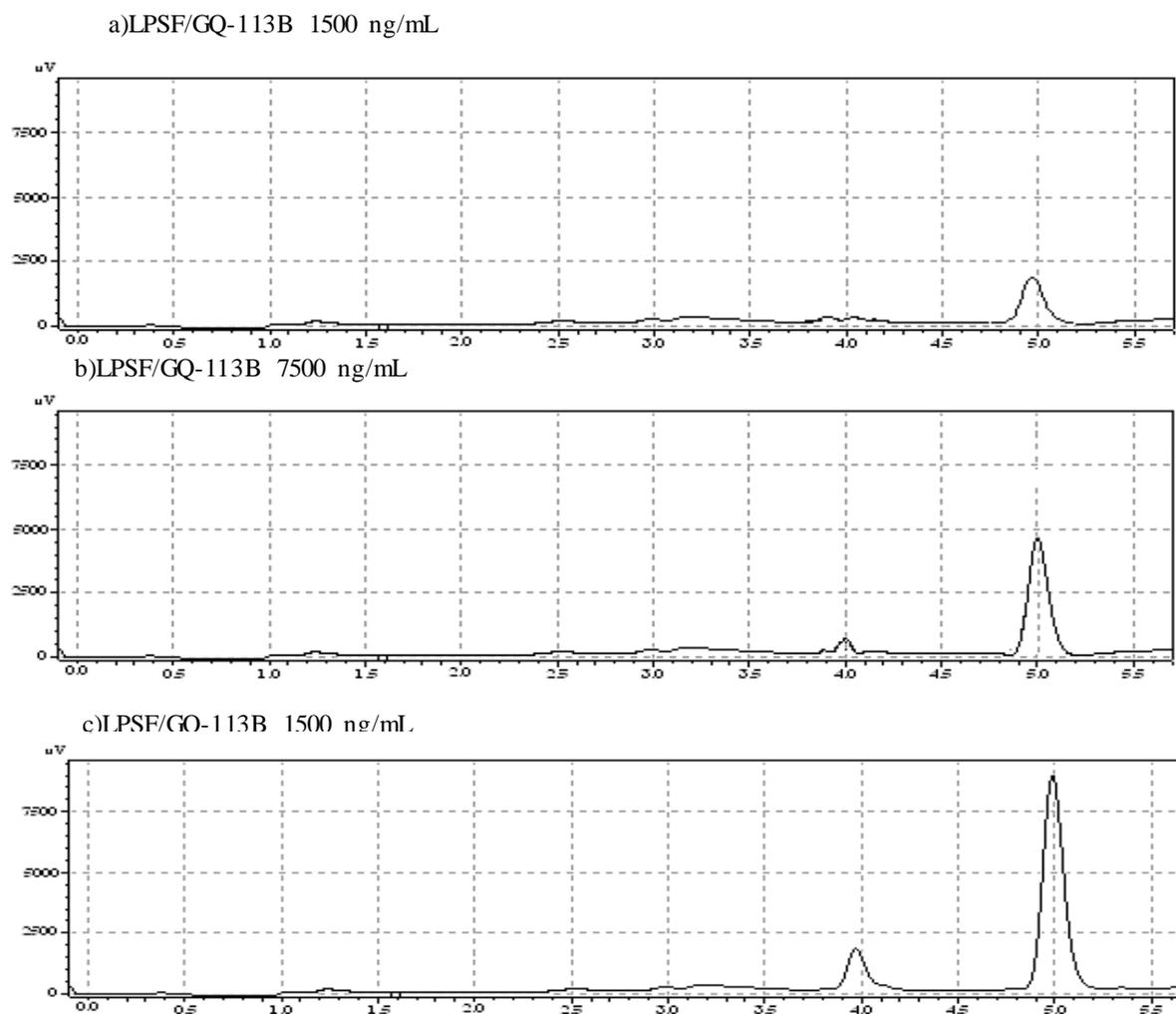


Figura 8. Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,14min na fase móvel ACN:Água:Ac. Acético 85:14:1 v/v/v nas concentrações de: a)1500, b)7500 e c)13000 ng/mL respectivamente

A mistura de acetonitrila com água ultrapura numa proporção de 85:15 v/v compoendo uma segunda fase móvel gerou os seguintes resultados para as mesmas amostras. As análises do LPSF/GQ-113B geraram sinais com tempo de retenção igual a **5.89 min.** mostradas nos cromatogramas da FIGURA 9.

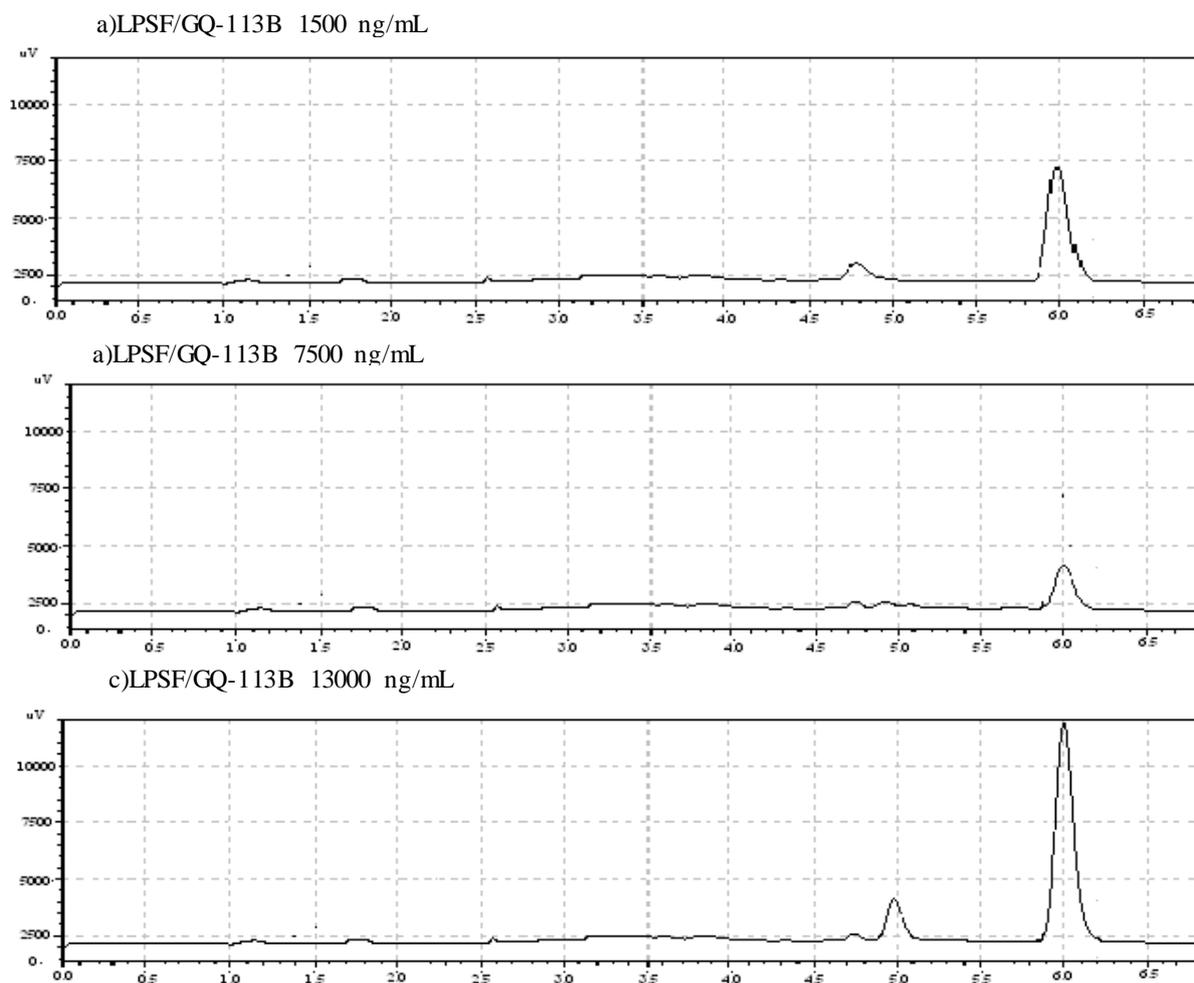


Figura 9. Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,89 min na fase móvel ACN:Água 85:15 v/v nas concentrações de: a)1500, b)7500 e c)13000 ng/mL respectivamente.

A mistura de acetonitrila com uma solução aquosa do tampão fosfato de amônio 30 mMol (pH 8,0) numa proporção de 85:15 v/v compondo uma terceira fase móvel, foi usada para a eluição das soluções-padrão aquosas do LPSF/GQ-113B nas concentrações dos controle de qualidade, geraram sinais com o tempo de retenção igual a **5.65 min**, mostrados no cromatograma da FIGURA 10.

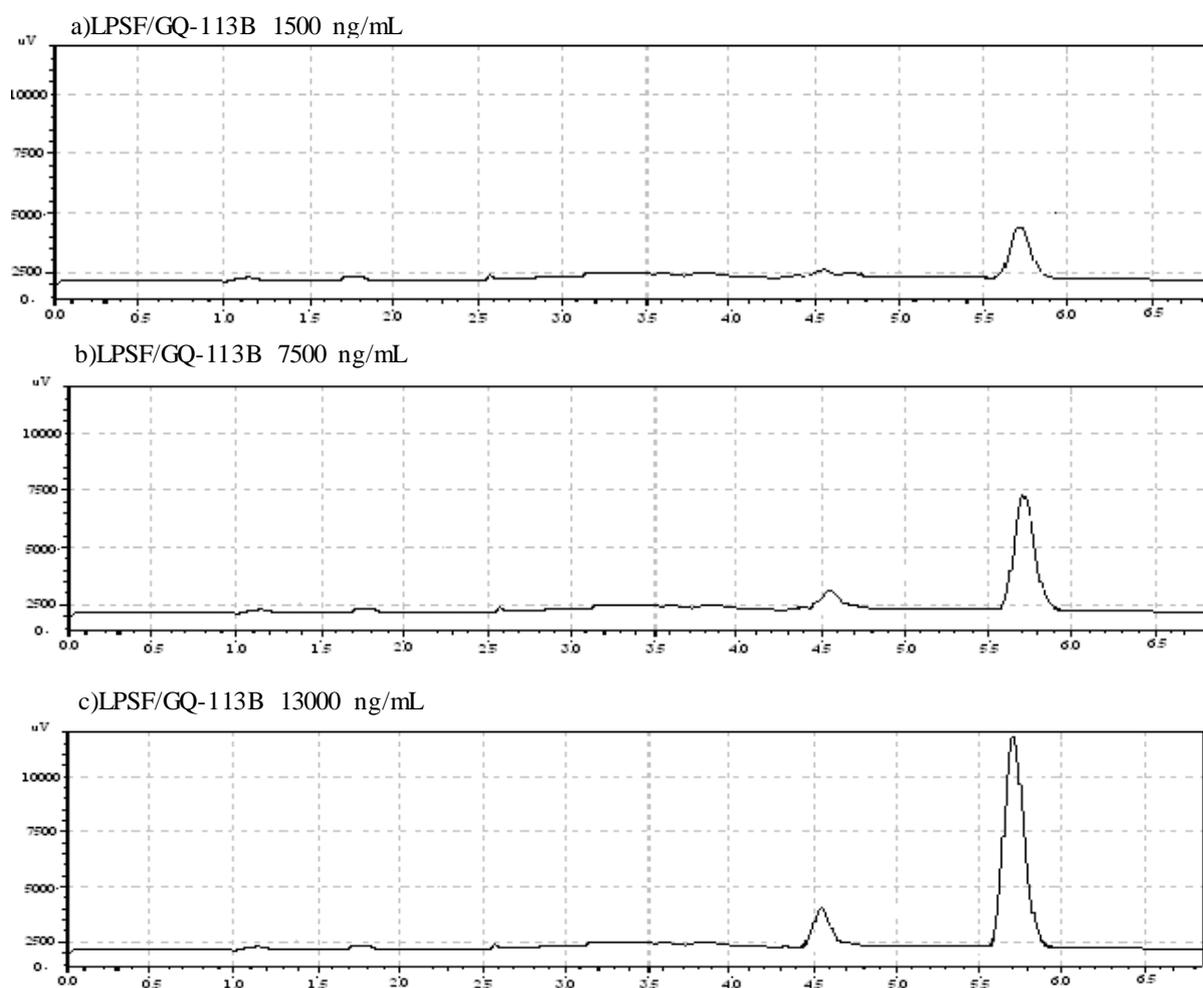


Figura 10 .Cromatogramas do composto LPSF/GQ-113B com os tempos de retenção em 5,65min na fase móvel ACN:Tampão fosfato de amônio 85:15 v/v/v nas concentrações de: a)1500, b)7500 e c)13000 ng/mL respectivamente

Entre todas as proporções testadas, compreendendo as misturas usando majoritariamente o metanol (MeOH:Água 40: 60, 65:35 e 85:15 v/v) e a acetonitrila (ACN:Água 40: 60, 65:35 e 85:15 v/v) com ou sem o adição de fosfato de amônio e ácido acético, aquelas eluídas com as fases móveis contendo ACN na proporção de 85% tiveram os resultados mais favoráveis com detecção do componente analisado entre 5.14 e 5.89 min.

Mais precisamente, a fase móvel composta pela mistura ACN: água: ácido acético 85:14:1 v/v/v, apresentou o resultado mais significante, por apresentar menor tempo de retenção (5,14 min), esse resultado reforça a hipótese de que o composto LPSF/GQ-113B em ambiente ácido sofreu algum grau de ionização, tornando a molécula mais polarizada, e dessa forma com redução do grau de afinidade pela fase estacionária apolar, eluindo mais

rapidamente. Nesse contexto, foi eleita a fase móvel mais adequada para o desenvolvimento e validação do trabalho.

Entre as corridas demonstradas acima, as diferenças entre as áreas dos picos, para as mesmas concentrações foram insignificantes, nesse caso a diferença de pH entre as fases móveis, não representou efeitos sob a concentração detectável do analito.

Os cromatogramas referentes às outras análises, incluindo as fases móveis com proporções de acetonitrila inferiores a 85% e também aquelas contendo metanol, tiveram um resultado menos expressivo e por isso não foram aqui representadas.

5.6 Delineamento do fluxo e da temperatura do forno

Os resultados gerados para as variações do fluxo em 0.5, 0.8, 1.0, e 1.2 mL/min estão listados na TABELA

Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção do LPSF/GQ-113B 1 (min) 1500 ng/mL ($n = 3$)
0.5	12.04
0.8	8.42
1.0	5.19
1.2	Pressão acima da permitida

Tabela 3. Variações dos tempos de retenção do analito LPSF/GQ-113B em função da variação do fluxo da fase móvel em 0.5, 0.8, 1.0 e 1.2 mL/min.

De acordo com os resultados gerados foi possível definir que o fluxo de 1 mL/min como o mais adequado para a análise, devido ao consumo mais baixo de solvente e pelo fato do tempo de retenção do analito ser mais curto.

O fluxo de 1.2 mL/min gerou uma pressão elevada no interior da coluna e foi decidido após isso, não se trabalhar com fluxos acima de 1.0 mL/min.

A análise da variação dos tempos de retenção do analito em função da variação da temperatura do forno foram discretos e estão apresentado na TABELA 4, para tal, o fluxo da fase móvel foi definido em 1 mL/min.

Tabela 4. Variações dos tempos de retenção do analito LPSF/GQ-113B em função da variação da temperatura do forno em 25, 30 e 40^o C.

Temperatura do forno (°C)	Tempo de retenção do LPSF/GQ-113B (min) 1500 ng/mL (n = 3)
25	6,18
30	5,9
40	5,14

O menor tempo de retenção obtido foi de 5.14 min com a temperatura do forno em 40° C, dessa maneira, esta temperatura, dentre as testadas, foi definida como a ideal para a análise.

5.7 Estudos de estabilidade do LPSF/GQ-113B

Essa etapa do estudo compreendeu a análise da estabilidade do LPSF/GQ-113B em soluções plasmáticas e em soluções-padrão aquosas em quintuplicata (n=5), nas concentrações referentes aos controles de qualidade (1500, 7500 e 13000 ng/mL).

Para o estudo de curta duração as amostras preparadas nas referidas concentrações foram armazenadas em temperatura ambiente por um período de 10h, e após isso, comparadas soluções de igual concentração recentemente preparadas a partir de uma solução mãe distinta.

No estudo de longa duração as amostras foram armazenadas por 24h sob refrigeração a temperatura de -20°C, e após isso, comparadas à soluções de igual concentração preparadas imediatamente antes da análise.

Nos teste envolvendo o congelamento e descongelamento das amostras, as mesmas foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, compreendendo períodos de 24h armazenados em *freezer* a -20°C seguidos por 1h em temperatura ambiente para descongelamento e novamente resfriadas, até completar três ciclos.

O estudo de estabilidade das soluções-padrão compreendeu a preparação das mesmas, a partir de uma solução mãe nas concentrações 1500, 7500 e 13000 ng/mL e foram então armazenadas por um período de 10h, sendo após análise, comparadas com os resultados de soluções-padrão nas mesmas concentrações recentemente preparadas.

Os erros relativos calculados para os diferentes estudos de estabilidade estão ilustrados na TABELA 5.

Tabela 5. Estabilidade das amostras de QC do LPSF/GQ113B em plasma de ratos Wistar sob diferentes condições de estocagem ($n = 5$)

Estabilidade (n=5)		Concentração (média \pm D.P.: ng/mL)		
		500 ^a	7500 ^b	13000 ^c
Congelamento e descongelamento				
Conc. inicial	(0 ciclo)	512.2 \pm 3.6	7516 \pm 8.6	13043.7 \pm 23.8
Conc. final	(3º ciclo)	497.0 \pm 2.1	7521 \pm 11.0	13028.8 \pm 14.9
Desvio (%)		- 2.68	+ 3.9	- 5.7
Longa duração				
Conc. inicial	(0 h)	502.1 \pm 0.9	7499 \pm 9.8	13098.9 \pm 35.3
Conc. Final	(24 h)	498.4 \pm 1.5	7496 \pm 7.6	13017.1 \pm 19.9
Desvio (%)		- 2.25	- 3.97	- 8.4
Curta duração				
Conc. inicial	(0 h)	500.2 \pm 2.2	7502.9 \pm 1.9	13118.7 \pm 8.9
Conc. Final	(10 h)	501.4 \pm 3.3	7504.8 \pm 3.2	13144.4 \pm 12.7
Desvio (%)		+ 0.74	+ 0.7	+ 6.3

^a Amostras de Controle de Qualidade Baixo

^b Amostras de Controle de Qualidade Médio

^c Amostras de Controle de Qualidade Alto

5.8 Recuperação

Amostras plasmáticas com concentrações referentes aos CQs (1500, 7500 e 13000 ng/mL), analisadas em quintuplicata ($n = 5$) foram submetidas a processos extrativos com os solventes orgânicos acetonitrila e metanol, nas proporções de 2:1 e 3:1 v/v de solvente e plasma (proporções com maiores índices de recuperação segundo POLSON, et al 2003).

Os resultados da precipitação protéica utilizando metanol na proporção 3:1, tiveram média recuperação de 66,4%, superior aos testes nas proporções de 2:1 que recuperaram apenas 61,7% do analito. Contudo, a precipitação protéica utilizando acetonitrila na proporção de 3:1 (acetonitrila:solução plasmática) proporcionou resultados para a recuperação bastante pronunciados, superiores a 92%. Os resultados referentes às precipitações usando acetonitrila na proporção 2:1, tiveram resultado médio de 82%. O percentual de recuperação para cada solvente em suas proporções distintas, estão representado na TABELA 4.

Tabela 6. Percentual de recuperação do analito LPSF/GQ-113B através do método da precipitação protéica, utilizado metanol e acetonitrila em duas proporções.

Proporção solvente:plasma	Recuperação do LPSF/GQ-113B (%) ($n = 5$)		
	1500 ng/mL	7500 ng/mL	13000ng/mL
Metanol 2:1	59.4	61.3	62.0
Metanol 3:1	67.6	66.8	65.5
Acetonitrila 2:1	80.7	78.1	84.8
Acetonitrila 3:1	94.2	92.2	97.3

Recuperação % = (Área média das soluções extraída/Área média das soluções-padrão extraídas) x 100

5.9 Seletividade

Para determinar a seletividade do método foram analisados e comparados em quintuplicata os cromatogramas obtidos a partir do plasma branco, de soluções plasmáticas do LPSF/GQ-113B com concentração conhecida e de soluções-padrão do composto na mesma concentração a partir da comparação das respectivas áreas dos sinais computados para cada grupo.

A análise dos cromatogramas das soluções do plasma branco demonstrou que todos os componentes endógenos detectáveis são eluídos antes dos três minutos para a fase móvel selecionada e não interferem diretamente no sinal do analito.

A comparação entre os sinais de resposta das soluções-padrão e as soluções extraídas não apresentaram diferenças relevantes em termos de concentração e área, dessa forma não foi evidenciado efeito de matriz sob a detecção do analito.

A FIGURA 11 mostra o cromatograma obtido a partir de uma solução plasmática extraída de 7500 ng/mL, retratando que os componentes plasmáticos detectados são eluídos totalmente até o tempo de três minutos e o sinal do analito é eluído em 5,14 min

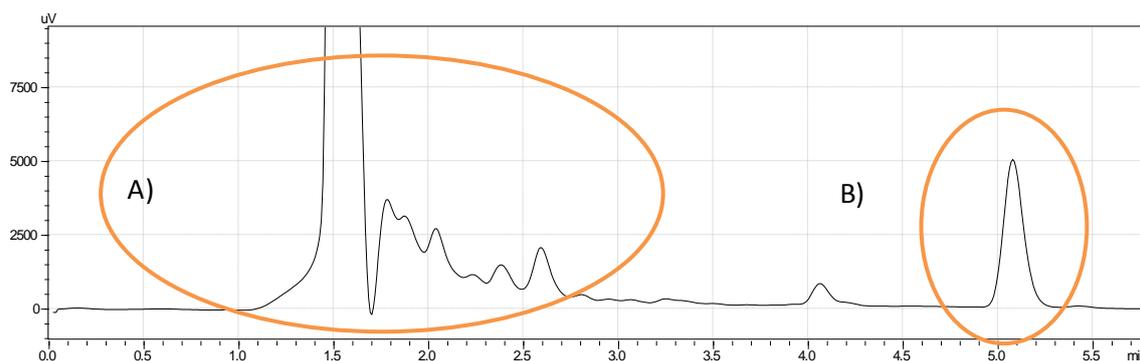


Figura 11. Cromatograma obtido a partir de uma extração de solução plasmática de LPSF/GQ-113B a 7500 ng/mL, mostrando em **A** os componentes plasmáticos eluídos antes de 3 min e em **B** o sinal do analito.

5.10 Limite inferior de detecção e limite inferior de quantificação

Injeções prévias de soluções-padrão do LPSF/GQ-113B com concentrações de 1000 ng/ml geraram resultados com precisão e exatidão aceitáveis. Dessa forma, para se pesquisar os limite inferior de detecção e limite inferior de quantificação, foram preparadas, a partir de uma solução mãe recente, soluções-padrão com concentrações decrescentes, inferiores a 1000 ng/mL (900, 800, 700, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 e 50 ng/mL).

Cada amostra foi analisada em quintuplicata e os resultados referentes às áreas dos picos detectados nos cromatogramas tiveram a exatidão e precisão calculadas. As soluções com concentração de 900-500 ng/mL apresentaram exatidão e precisão, as amostras com concentrações inferiores a 500 ng/mL não apresentaram exatidão e precisão dentro dos limites aceitáveis, por apresentarem desvios padrão muito elevados. Dentre estas, as soluções de concentração 200 ng/mL apresentaram alturas de pico da ordem de 3:1 em relação ao ruído da linha de base, e esse valor foi considerado o limite inferior de detecção do método. A concentração de 500 ng/mL foi definida como o limite inferior de quantificação do método.

5.11 Curva de Calibração e Linearidade

A definição do limite inferior de quantificação (LOQ) em 500 ng/mL para o detector UV-fixado do cromatógrafo líquido, definiu o ponto inicial da curva de calibração, os outros seis pontos foram definidos a partir do seguinte esquema: 2x LIQ, 4x LIQ, 6x

LIQ, 8x LIQ, 12x LIQ, 16x LIQ e 32x LIQ, fixando respectivamente as concentrações de 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL.

A exatidão e a precisão das seis curvas de calibração construídas, sendo três do ensaio intra-dia e três pertencentes aos ensaios inter-dia foram calculados através do desvio padrão relativo (D.P.R.) e seus resultados estão expostos na TABELA 7. Os erros relativos referentes às análises inter-dias estão compreendidos entre -1,43 e 7,31e os D.P.R. (%), compreendidos entre 3,52 e 9,8

Tabela 7. Precisão e exatidão Intra-dia da curva padrão.

Concentração do plasma contaminado com LPSF/GQ-113B (ng/mL)	Inter-dias				Intra-dia	
	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R. (%) (n=3)	ER (%)	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R. (%) (n=3)	ER (%)
500	512.13 ± 47,26	9,28	2,42	488.57 ± 47.67	9,75	-2.28
1000	1073.07 ± 105,16	9,8	7,31	1092.4 ± 145.04	13,27	9,24
2000	2115,53 ± 164,16	7,76	5,77	2081.49 ± 200,89	9,65	4,05
4000	4089.68 ± 341,34	8,35	2,24	4020.48 ± 376.59	9,36	0,51
6000	5989.67 ± 458.35	7,65	-0,17	6025.33± 169.45	2,82	0,42
8000	7864.61 ± 313.16	3,98	-1,7	7931.62 ± 433.28	5,46	-0,85
16000	15770. 39 ± 555.46	3,52	-1,43	15924.57 ± 475.41	2,98	-0,47
Σ RE (%)			14,44			10,62

$$ER \% = \left[\frac{\bar{X}}{\text{concentração teórica}} - 1 \right] \times 100$$

Todos os pontos analisados apresentaram precisão adequada, evidenciada com valores de D.P.R abaixo de 15% e também apresentaram exatidão adequada, pois os valores reais obtidos das concentrações não desviaram acima de 20% para o LIQ e 15% para os demais valores da concentração teórica atestada para cada ponto.

A FIGURA 12 ilustra uma das curvas de calibração obtida, relacionando as áreas dos picos no eixo x e as concentrações das amostras analisadas no eixo y. Os sete pontos demonstrados na curva, correspondem as concentrações obtidas e a TABELA 8 indica a equação da reta, além do coeficiente de correlação angular (r^2) da curva de calibração exibida abaixo.

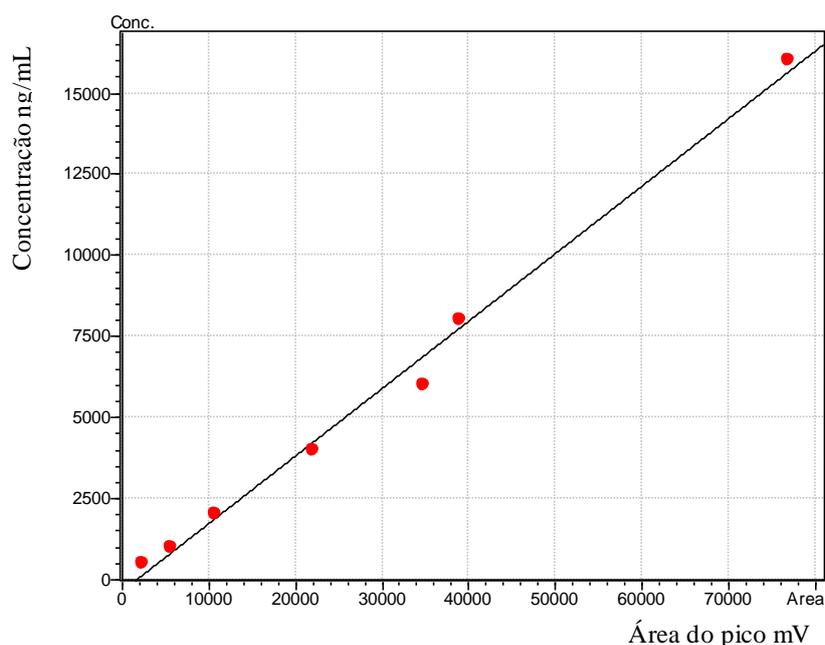


Figura 12. Curva padrão obtida pela injeção de soluções extraídas de plasma contaminado nas concentrações de 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 ng/mL.

Tabela 8. Equação da reta, coeficiente de correlação e coeficiente de determinação da curva de calibração representada na figura 11.

Equação da reta	r
$Y = 0.2080168X - 339.7478$	0.9966

A construção das curvas de calibração intra e inter-dias para a avaliação da linearidade do método demonstraram coeficientes de correlação (r) superiores a 0,98. Valor mínimo exigido pela resolução 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA que regulamenta estudos bioanalíticos.

Os coeficientes de correlação atestaram a linearidade das curvas construídas com os seguintes valores: 0.999765, 0.998678, 0.996636, 0.999214, 0.997718 e 0,997564, de maneira que pode se considerar o método proposto linear.

As curvas de calibração para o estudo da linearidade apresentaram exatidão e precisão com desvios padrões relativos inferiores a 20% para o limite inferior de detecção e inferiores a 15% para os demais pontos.

5.12 Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos confirmaram que o método proposto é preciso e exato. A partir dos valores calculados para os desvios padrão relativos, verificou-se que a variação das concentrações para os CQB, CQM e CQA respectivamente nas concentrações de 1500, 7500 e 13000 ng/mL estão idealmente abaixo dos 15% permitido, enquanto que a variação para o LIQ na concentração de 500 ng/mL está também dentro dos limites exigidos para precisão e exatidão, tendo um D.R.P. abaixo de 20%.

A TABELA 9 mostra os valores médios recuperados experimentalmente para cada concentração em quintuplicata, os desvios padrões entre os resultados, os desvios padrão relativos e os erros relativos para cada concentração dos controles de qualidade analisados.

Tabela 9. Precisão e exatidão na quantificação do LPSF/GQ-113B em amostras de plasma de ratos Wistar (análises com amostras de plasma contaminado em quatro diferentes concentrações)

Plasma contaminado com LPSF/GQ-113B (ng/mL)	Intra-dia			Inter-dias		
	Concentração recuperada (media \pm D.P.) (ng/mL)	D.P.R (%) (n=5)	ER (%)	Concentração recuperada (media \pm D.P.) (ng/mL)	D.P.R (%) (n=5)	ER (%)
500	490.93 \pm 28.67	5.83	-1.81	459.77 \pm 39.99	8.69	-8.04
1500	1507.05 \pm 51.67	3.43	0.47	1520.3 \pm 67.26	4.42	1.33
7500	7545.46 \pm 252.6	3.34	0.6	7553.17 \pm 179.75	2,38	0.7
13000	13030.53 \pm 244.27	1.87	0.23	12960.98 \pm 279.66	2,15	-0.3

$$ER \% = [(\bar{X} \text{ das concentrações experimentais} - \text{concentração teórica}) / \text{concentração teórica}] \times 100$$

As análises intra-dia em quintuplicata para cada concentração geraram valores de concentração para os CQs muito próximos dos valores obtidos das concentrações teóricas padronizadas. Para o LIQ, as concentrações variaram entre (447.22 e 529.56) das quinze amostras analisadas correspondentes as três análises intra-dia. Os valores experimentais coletados apresentaram D.P.R. igual a 5,83% demonstrando repetibilidade entre os resultados. Para as demais amostras, as concentrações mínimas e máximas obtidas, foram entre 1454.1 e 1554.94 para os CQB, 7121.39 e 8029.38 correspondendo aos CQM e

12579.4 e 1309,98 correspondentes aos CQA, apresentando respectivamente D.P.R. de 3.43, 3.34 e 1.87%.

Em sequência, análises inter-dias geraram valores de concentração para os CQs, muito próximos dos valores teóricos padronizados. Para o LIQ, as concentrações variaram entre (406.1 e 518.87) das quinze amostras analisadas correspondentes as três análises intra-dia. Os valores experimentais coletados apresentaram D.P.R. igual a 8.69% demonstrando repetibilidade entre os resultados. Para as demais amostras, as concentrações mínimas e máximas obtidas foram entre 1400.78 e 1581.81 para os CQB, 7434.98 e 7758.99 correspondendo aos CQM e 12629.22 e 13370.27 correspondentes aos CQA, apresentando respectivamente D.P.R. De 4.42, 2.38 e 2.15%.

Tais dados permitem concluir que os dados obtidos nos ensaios intra e inter-dias tornam o método preciso e exato, devido as concordâncias entre os valores experimentais obtidos e os teóricos, além da repetibilidade entre os resultados para cada amostra, ambos inseridos dentro dos limites para os desvios padrão relativo permitidos.

6 DISCUSSÃO

As tiazolidinadinas têm sido pesquisadas em todo mundo, pois demonstram interessantes atividades biológicas, o composto tiazolidinadiônico LPSF/GQ-113B sintetizado pelo grupo (LPSF-GPIT_UFPE), demonstrou significativa atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação, despertando o interesse em desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para quantificação deste fármaco em plasma de ratos Wistar. Um método bioanalítico sensível, preciso e exato representa uma importante etapa para estudos farmacológicos e/ou toxicológicos de moléculas candidatas a fármacos.

O desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de vários estágios como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação do composto de interesse. Fatores como a fase móvel, a vazão, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos com critério. A validação do método analítico é importante porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método (CAUSON, 1997).

Os valores teóricos referentes às propriedades físico-químicas do LPSF/GQ-113B, permitiram a identificação de algumas evidências, como por exemplo, a partir do valor fornecido para o coeficiente de solubilidade ($\log P$), verificou-se que o composto tem natureza apolar e o valor para o coeficiente de solubilidade ($\log S$) indicou sua baixa solubilidade em água. O preditor virtual não forneceu nenhum dado que indicasse o coeficiente de ionização do LPSF/GQ-113B, porém a ausência desse dado não impossibilitou o desenvolvimento do método.

É muito comum a utilização da acetonitrila e do metanol em proporções diferentes com a água na composição de fases móveis em diversos sistemas cromatográficos na análise de diferentes fármacos (MEYER, 2004; BEDOR, 2007; LANÇAS 2009). A avaliação experimental da solubilidade do LPSF/GQ-113B em diferentes solventes orgânicos demonstrou que o mesmo apresenta uma maior solubilidade em acetonitrila. Trabalhos envolvendo o desenvolvimento e validação de tiazolidinadinas, classicamente utilizam acetonitrila como componente orgânico da fase móvel utilizada em CLAE-UV ou CLAE-EM (SRIPALAKIT et al, 2006; KOLTE et al 2002).

Através da análise da estrutura molecular do LPSF/GQ-113B, não se percebeu a presença de hidrogênios lábeis, por outro lado algumas regiões nucleofílicas, representadas pelos elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio e enxofre, demonstram a capacidade da molécula em captar prótons de hidrogênio livres em solução, o que atribui uma natureza básica ao fármaco, FIGURA 13.

A composição da fase móvel foi otimizada através de diversas triagens visando alcançar uma boa resolução e simetria dos picos, como também um tempo de retenção curto. Isso foi possível após a análise de diferentes proporções utilizando água, metanol, acetonitrila e modificadores orgânicos. A definição das proporções para a fase móvel composta por uma mistura de água, acetonitrila e ácido acético numa proporção de 85:14:1 v/v/v (pH 6,0), demonstrou um tempo de retenção curto e uma boa seletividade.

A utilização de modificadores de pH confirmaram a natureza básica da molécula a partir dos tempos de retenção obtidos em corridas analíticas diferentes usando CLAE-UV. A presença do ácido acético, tornando a fase móvel levemente ácida (pH 6.0) resultou em cromatogramas, cujos respectivos sinais do LPSF/GQ-113B tiveram tempo de retenção de 5.1 ± 0.2 min, enquanto a alcalinização da fase móvel com fosfato de amônio 30 mMol (pH 8,0) gerou picos com o tempo de retenção igual a 5.65 ± 0.2 min, a diferença entre os tempos de retenção para os dois sistemas é explicada pela modificação na ionização que a molécula sofre em presença de pHs diferentes, estando a mesma em meio ácido mais ionizada, fazendo com que tenha menor interação com a fase reversa de baixa polaridade e elua mais rapidamente na fase móvel.

O interesse em buscar análises cromatográficas com tempos de retenção menores no desenvolvimento e validação de metodologias bioanalíticas de fármacos está relacionada à necessidade de otimização do processo, de modo que todas as corridas necessárias sejam realizadas com velocidade e eficiência, e tenha o tempo total do estudo diminuído, evitando a degradação do analito em contato com outros componentes do sistema e reduzindo o gasto de solventes.

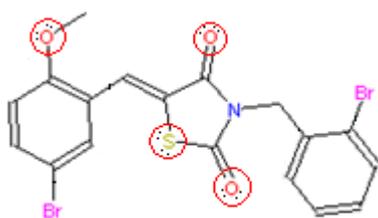


Figura 13. Estrutura do composto LPSF/GQ-113B com átomos que possuem elétrons livres de natureza nucleofílica.

A determinação do fluxo adequado foi delineado através da velocidade de eluição do analito através do sistema cromatográfico em função da pressão de bombeamento suportada pelo sistema, do consumo de fase móvel e do tempo de retenção do analito.

Alguns trabalhos vêm utilizando fluxos de 1.0-1.2 mL/min na eluição de diferentes tiazolidinadionas em CLAE, Kolte et al (2002), analisando amostras plasmáticas de rosiglitazona, uma molécula tiazolidinônica, em uma fase móvel com fluxo de 1.2 mL/min, obteve sinal do analito em 8.3 min. Sun et al (2008), desenvolveu e validou um método bioanalítico para quantificação MCC-555, outra tiazolidinadiona com o sistema operando a um fluxo de 1.0 mL/min e obteve um tempo de retenção para o composto de 12 min. O presente trabalho utilizou um bombeamento da fase móvel de 1.0 mL/min, com eluição do LPSF/GQ-113B em 5.14 min, demonstrando dessa maneira condições de análise mais rápidas que as demais glitazonas referenciadas.

A escolha da coluna cromatográfica (C_{18} , 150mm x 4,6mm x 5 μ m), deve-se a mesma ser bastante difundida como uma coluna padrão para análise de substância de baixa polaridade. Esse tipo de recheio é o mais utilizado em cromatografia de fase reversa, fato esse que favorece a C_{18} como coluna de primeira escolha. De acordo com Snyder et al (1997), essa é a melhor coluna para análise de fármacos com grupos ionizáveis, pois a mesma apresenta boa relação entre eficiência cromatográfica e tempo de análise. Costumeiramente a coluna C_{18} é utilizada na análise de tiazolidinadionas por CLAE (SRIPALAKIT et al, 2006; HE et al, 2006; SUN et al, 2008).

A escolha da temperatura do forno, onde fica acondicionada a coluna, alterada na intenção de diminuir a viscosidade da fase móvel pela elevação da temperatura ao passar pela fase estacionária, foi estudado também como um fator determinante na redução do tempo de retenção do analito, sendo três temperaturas diferentes avaliadas, 25, 35 e 40° C.

Sob uma temperatura de 40° C obteve-se o menor tempo de retenção na análise do LPSF/GQ-113B (5.14 min). Não foram evidenciados sinais de degradação do composto em função da variação de temperatura, característica avaliada pela manutenção das mesmas áreas e alturas do sinal do analito nos cromatogramas referentes às três temperaturas testadas, o que evidencia a manutenção da mesma concentração do composto não observando nenhuma possível degradação e nenhum outro sinal detectável no cromatograma que porventura viesse a ser um produto de degradação devido ao calor.

Os ensaios de estabilidade seguiram as normas da ANVISA e de acordo com os resultados obtidos, não houve degradação do LPSF/GQ-113B.

Têm-se utilizado cada vez mais a precipitação protéica por agente orgânico como método de escolha para a recuperação de fármacos em matriz biológica plasmática. A utilização da acetonitrila demonstrou em muitos trabalhos uma recuperação do analito de interesse muitas vezes com um elevado percentual de recuperação e repetibilidade.

Nesse trabalho testamos dois métodos de extração por precipitação protéica utilizando proporções diferentes de metanol e acetonitrila como agentes precipitantes de amostras de plasma contaminadas com o LPSF/GQ-113B. Os resultados mostraram que embora o metanol apresente algumas vezes uma interessante capacidade extrativa, a acetonitrila proporcionou uma maior recuperação do LPSF/GQ-113B em plasma de ratos Wistar.

No trabalho de Kolte et al (2002) a extração da rosiglitazona em amostras de plasma humano utilizando acetonitrila, proporcionou uma recuperação média de 59,4%, enquanto que o trabalho de He et al (2006) reportou uma recuperação de 78,5% da mesma tiazolidinadiona na mesma matriz biológica, utilizando o mesmo solvente. No presente trabalho, foi utilizada uma técnica semelhante de extração com uma proporção de 3:1 (plasma contaminado com o LPSF/GQ-113B/ acetonitrila). Foram evidenciadas elevadas taxas de recuperação, com valores médios superiores aos trabalhos anteriores citados, da ordem de 94, 92 e 97% referentes às concentrações CQB, CQM e CQB.

Em função destes resultados, o método utilizando acetonitrila na proporção 3:1 (acetonitrila:plasma) foi considerado ideal para a extração da droga LPSF/GQ-113B, presente em plasma de ratos Wistar, sendo pronunciadamente superior aos resultados das recuperações com metanol, que foram na proporção 3:1 as respectivas concentrações 67 , 66 e 65 % referentes aos CQB, CQM e CQB. Tal método além de fornecer excelente recuperação, é de prática aplicação, além de ter um custo bastante reduzido em relação a outras técnicas.

Outras técnicas extrativas também são largamente utilizadas na recuperação de fármacos em matrizes biológicas, alguns trabalhos usam a extração líquido-líquido ou a extração em fase sólida como técnica extrativa de tiazolidinadionas em plasma, humano ou animal com alto percentual de recuperação (WATT et al 2000; KIRCHHERR & KÜHN-VELTEN; 2005; MACEK et al, 2006).

Por ser um método extração de fácil aplicação, muitos componentes endógenos da matriz podem ser co-extraídos juntamente com o analito, a análise dos cromatogramas das soluções do plasma branco, demonstrou que todos os componentes endógenos detectáveis

são eluídos antes dos três minutos para a fase móvel selecionada e não interferem diretamente no sinal gerado na detecção do LPSF/GQ-113B, já que para a fase móvel e também para os outros parâmetros cromatográficos definidos, o tempo de retenção do analito foi em média de 5.0 minutos.

A facilidade de separação dos componentes da amostra permitiu que o modo isocrático de eluição continuasse a ser utilizado no desenvolvimento e validação do método, pois não houve a constatação de interferências entre picos detectados de componentes endógenos da matriz e o pico gerado pelo analito de interesse, dessa maneira o fluxo de 1.0 mL/min permaneceu constante durante toda a corrida.

No trabalho de Kolte et al (2002), a rosiglitazona e a pioglitazona (tiazolidinadionas comerciais) utilizando condições cromatográficas semelhantes e eluição isocrática, apresentaram um tempo de retenção de 8.7 e 17.95 min respectivamente, enquanto que no trabalho de Sun et al (2008), também em condições semelhantes, o MCC-555 (nova tiazolidinadiona hipoglicemiante) apresentou um tempo de retenção de 10.72 min. No nosso trabalho no entanto, foi possível alcançar através de prévia otimização das condições cromatográficas, um tempo de retenção de uma molécula tiazolidinadiônica (LPSF/GQ-113B), (5.14 min) menor que os demais, o que garante vantagens como um tempo de análise menor, economia de solventes orgânicos e menor tempo de exposição da droga à degradação.

O volume de injeção usado (20 μ L) é padrão quando se faz uso de injetores manuais, a injeção de volumes baixos como este, garante que não haja sobrecarga dos sítios de ligação do material de empacotamento da coluna o que poderia causar perda de eficiência na separação dos componentes da amostra.

É possível que a utilização de detectores mais sensíveis, como por exemplo, um espectrômetro de massas, garantisse uma maior sensibilidade na análise de soluções do composto LPSF/GQ-113B, entretanto a determinação quantitativa do LPSF/GQ-113B em plasma de ratos Wistar numa faixa de concentração entre 500 e 16000 ng/mL possivelmente estarão dentro de uma faixa coerente em futuros estudos farmacocinéticos no mesmo modelo animal.

7 CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido para o composto LPSF/GQ-113B apresentou exatidão e precisão em seus ensaios intra e inter-dias, com uma taxa de recuperação elevada, através do método de precipitação protéica, utilizando o solvente orgânico acetonitrila como agente precipitante, foi possível recuperar com exatidão e precisão mais de 90% do composto a partir do plasma contaminado,

Os outros parâmetros cromatográficos delineados, como o ajuste da fase móvel, permitiu que o pico gerado pelo composto LPSF/GQ-113B fosse simétrico e isento de interferências, com tempo de retenção definido em aproximadamente 5.14 min. Todos os constituintes endógenos da matriz biológica detectáveis, não interferiram na quantificação do composto pesquisado, eluindo antes dos três minutos.

O método demonstrou linearidade e seletividade. O composto LPSF/GQ-113B manteve suas características durante os estudos de estabilidade, demonstrando baixo teor de degradação, confirmado pelos cálculos do erro relativo.]

Através da determinação dos parâmetros cromatográficos adequados foi possível garantir a reprodutibilidade nos resultados de todas as amostras analisadas, dessa forma pode-se concluir que o método apresenta relativa robustez frente às possíveis interferências inter análises.

Através de projetos que tenham por objetivo desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação de novos coimpostos bioativos em matriz biológica animal, é possível fomentar estudos de base para o delineamento do comportamento de tais compostos em modelos animais, após a sua administração (farmacocinética), podendo dessa maneira prever as peculiaridades das interações entre o componente bioativo e o organismo humano em estudos futuros.

Pelo fato do composto tiazolidinônico LPSF/GQ-113B, apresentar interessante atividade anti-inflamatória, a validação desenvolvida permitirá a realização de uma nova etapa de estudos farmacocinéticos, visto que sua atividade biológica já foi confirmada em estudos prévios, no trabalho de Silva e colaboradores (2008), faz-se necessário conhecer agora como tal composto se comporta submetido agora a um estudo *in vivo*, para a elucidação de aspectos importantes como, velocidade de absorção, efeito de primeira passagem hepática, tempo de meia vida, concentração plasmática máxima, etc.

Propriedades essenciais para determinação da possibilidade de um composto sintético bioativo tornar-se fármaco.

8. PERSPECTIVAS

A validação de metodologias bioanalíticas de drogas em plasma animal é essencial para que seja definido um projeto quantitativo para que possa se determinar o comportamento da mesma quando essa for administrada a um modelo animal.

O Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação quantitativa do LPSF/GQ-113B em plasma de ratos Wistar é um estudo de base, e poderá ser utilizado para estudos importantes na cadeia de desenvolvimento do composto LPSF/GQ-113B, como estudos toxicológicos, farmacocinéticos e de biodisponibilidade em ratos Wistar.

9 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, B. L. *et al.*; Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high throughput bioanalytical support of drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2. p. 53-56. 2002.
- ALLAHTAVAKOLI, M.; SHABANZADEH, A. P.; SADR, S. S.; PARVIZ, M.; DJAHANGUIRI, B. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces infarction volume and neurological deficits in a embolic model of stroke. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 33(11), p. 1052-1058. 2006.
- ALNOUTI, Y.; SRINIVASAN, K.; WADELL, D.; BI, H.; KAVETSKAIA, O.; GUSEV, A.I. Development and application of a new on line SPE system combined with LC-MS-MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma, *Journal of Chromatography A*, v. 1080, n.2, Jul 8, p. 99-106. 2005
- AMATO, A. A. Investigação da atividade farmacológica de bensilideno- e acridinilideno-tiazolidinedionas e de isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais. 138p. Tese (Doutorado em ciências da saúde). Universidade de Brasília – UNB, Brasília, 2008.
- APPEL, S.; MIRAKAJ, V.; BRINGMANN.; WECK, M. M.; GRUNEBACH, F.; BROSSART, P. PPARgamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. **Blood**, v.106, p. 3888-3894. 2005.
- AQUINO-NETO, F. R.; NUNES, D.S.S.; **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 187p.
- ARAGAO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B.; Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, 2009.
- ARAÚJO, L. F.; SOEIRO, A. M.; FERNANDES, J. L. C. V. S. JÚNIOR. Eventos cardiovasculares: Um efeito da classe dos inibidores de COX-2. **Arq. Brás Card.** v. 85, n.3, Setembro 2005.
- BANSAL, S.; DeSTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **Pure Appl. Chem**, v.74, n.5, p. 835-855, 2002.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Solid-phase extraction (DPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water, *Química Nova*, v. 24, n. 2, 11 de outubro, p. 172-175. 2001.

BEDOR, D.C.G. Desenvolvimento e validação de metodologias bioanalíticas para estudo dosagem e de antibióticos em plasma humano. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2007.

BOULANGER, B.; CHIAP, P.; DEWE, W.; CROMMEN, J.; HUBERT, P.; An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations, **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 8, n. 32, p. 753-765. 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A agência Nacional de Vigilância Sanitária Aprova “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 02 jun. 2003.

BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scand J Rheumatol**. v.33:1-6. 2004.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.

CHEN, H.; MONTAGNANI, M.; FUNAHASHI, T.; SHIMORUMA, I.; QUON, M. J. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. **J Biol Chem**; 278:45021-6. 2003.

CHEN, S. D.; WU, H. Y.; YANG, D.I.; LEE, S. Y. SHAW, F. Z.; LIN, T. K.; LIOU, C. W.;

CHUANG, Y. C. Effects of rosiglitazone on a global ischemia-induced hippocampal injury and expression of mitochondrial uncoupling protein 2; **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 351 (1), 198-203. 2006.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC. 1ª Ed, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1998.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna** 4ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 1994.

DAVID S. L.; What makes a good anti-inflammatory drug target?. **Drug Discovery Today**. Cambridge, MA, USA. v. 11, n. 5/6. 2006.

DUBUQUOY, L.; ROUSSEAU, C.; THURU, X.; PEYRIN-BIROULET.; ROMANO, O.; CHAVATTE, M.; CHAMAILLARD, M.; DESREUMAX.; PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. **Gut**, v.55, p.1341-1349,. 2006.

ERDMANN, E.; WILCOX, R. G.; weighing up the cardiovascular benefits of thiazolidinedione therapy: the impact of increased risk of heart failure. **European Heart Journal**, v. 10. n. 1093. p. 12-20. 2008.

EUN, C. S.; HAN, D. S.; LEE, S.; PAIK, C. H.; CHUNG, Y. W.; LEE, J. I.; HAHM, J. S. Attenuation of colonic inflammation by PPAR γ in intestinal epithelial cells: effect on Toll-like receptor pathway. **Digest. Dis. Sci.** v. 51, n.4, p. 693-697, 2006.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo, **Química Nova**, v.1, n.1, 1998.

FERRE, P. The biology of peroxisome proliferators-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. **Diabetes**. v.53, S43-S50. 2004.

FLOWER, R. J. The development of COX 2 inhibitors. **Nature Reviews**. V. 2. 2003.

GAYATHRI, B.; MANJULA. N.; VINAYKUMAR, K. S.; LAKSHMI, B. S.; BALAKRISHNAN, A. Pure compound from serrata extract exhibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF- α , IL-1 β , NO and MAP kinases. **Int. Immunopharmacol.** v.7, p.473-482. 2007.

GLASS C. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. **J Clin Invest**; v.116, p.556-560. 2006.

GOMES. M. B.; Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia**, v.50, n.2, 2006

GONÇALVES, T. M. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (Anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios. 97 p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2005.

HARRIS, D.C. . **Quantitativa Chemical Analysis**. New York: W. H. Freeman and Company. 1998.

HARTMANN. C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; McDOWALL R. D.; Validation of bioanalytical chromatographic methods **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 17. p. 193-218. 1998.

HE, J.; HU, Y. F.; DUAN, L. F.; TAN, Z. RE.; WANG, L. S.; WANG, D.; ZHANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; TU, J. H. YAO, Y. M. Sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 43 P, 580-585, 2006.

HE, J.; HU, Y.F.; DUAN, Z. R.; TAN, L. S.; WANG, D.; WANG, W.; ZHANG, Z.; LI, J.; LIU, J. H.; TU, Y. M.; YAO, HONG-HAO ZHOU. Sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.43, p 580-585, 2006.

HE, J.; HU, Y. F.; DUAN, L. F. et al. Sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 580-585, 2007.

HENNION, M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling

HERRERA, F.; MAYO, C. J.; ROSA, M. V. M.; RODRIGUEZA, I. A. C.; Cytotoxicity and oncostatic activity of the thiazolidinedione derivative CGP 52608 on central nervous system cancer cells. *Cancer Letters*, v. 211, P. 47-55, 2004.

HRUSKA, W. M.; FRYE, F. R.; Simplified method for determination of rosiglitazone in human plasma, **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 317-320, 2004.

HUBERT, PH.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory, **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 135-148. 1999.

SILVA, J. C. Desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2, 4-dionas: síntese, propriedades físico-químicas, caracterização estrutural e avaliação biológica: Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2008. Recife, 2008.

KANG. X.; WANG, FENG.; XIE, Z.; LI Huande. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of rosiglitazone and gemfibrozil in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 887, p 645–648, 2009.

KAPOOR, M.; KOJIMA, F.; YANG, L.; GROFFORD, L.J. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. **Prostag. Leukotr. Ess. Fatty Acids**. v. 76, p. 103-112, 2007.

- KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. HPLC for pharmaceutical scientists. 1^a ed. Wiley Interscience, New York, 2007.
- KORFMACHER, W. A.; Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery today**, v.10, n.2, p.1357-1367, 2005.
- LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna HPLC/CLAE. 1^o Ed, Átomo, Campinas, 2009.
- LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE). São Carlos: Rima editora. 2004. 96p
- LAPPAS, M.; PERMEZEL, M.; HOLDWORTH, S. J.; PORTA, G. Z. A.; RICE, G. E. Antiinflammatory effects of a cyclopentenone isoprostane 15-A2-IsoP in human gestational tissues. **Free Radical Bio. Med.** v.42, p. 1791-1796, 2007.
- Lastra FARM HOSP**, v.30, n.6, p. 374-378, 2006.
- LI, M.; PASCUAL G.; GLASS, C. K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxid synthase gene. **Mol. Cell. Biol.** v.20, p. 4699-4707. 2000.
- LINFORD, N. J.; BEYER, R. P.; GOLLAHON, K.; KRAJCIK, R. A.; MALLOY, V. L., DEMAS, V.; BURMER, G. C.; RABINOVITCH, P. S. Transcriptional response to aging and caloric restriction in heart and adipose tissue. **Aging Cell**, v.6, p. 673-688. 2007.
- LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSORESN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis, **Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied**, c.689, n.1, p.221-237. 1997.
- LINTON, M. F.; FAZIO, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 4, p. 116-123, 2004.
- LITTLE, D.; JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Cyclooxygenase (COX) Inhibitors and the intestine. **J. Vet. Intern. Med.** v.21, p. 367-377, 2007.
- LIU, H. B.; HU, Y. S.; MEDCALF.; R. L.; SIMPSON, R. W.; DEAR, A. R. Thiazolidinediones inhibit TNF- α induction of PAI-1 independent of PPAR γ activation. **Biochem Biophys Res Commun**; 334:30-7. 2005.
- LUO, Y.; YIN, W.; SIGNORE, A. P.; ZHANG, F.; HONG, Z.; WANG, S.; GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by peroxisome proliferators-activated receptor gamma agonist rosiglitazone. **J. Neurochem.** v.97, p.435-448. 2006.

- MACEK, J.; KLÍMA, J.; PTÁČEK, P. Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography. **Pharmazie**, v.54, p 122-128, 2005.
- MAGALHÃES, L. R. **Síntese e Avaliação das Atividades Antiinflamatória e Antinociceptiva de Derivados 5-benzilideno-3-(fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona**. 2007. (Doutorado e Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Brasil.
- MALDANER, L.; JARDIM I.; FONTES, S. C.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n.1, p. 214-222, 2009.
- MAMIDI, N. V. S. R.; KUMAR, V. V. S.; CHALUVADI, M. R.; Validated HPLC method for determination of PAT-5A, an insulin sensitizing agent, in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 251-255, 2000.
- MARIÑO, E. L.; ALBERT, V.; FERRER, M. S. M.; P. MODAMIO, C. F.; Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC.
- MEYER, R. V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4° ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- MISL'ANOVA C.; HUTTA, M. Influence of various biological matrices (plasma, blood microdialysate) on chromatographic performance in the determination of b-blockers using an alkyl-diol silica precolumn for sample clean-up. **Journal of Chromatography B**, v.765, p.167-177, 2001.
- NETO & NUNES. *Cromatografia- Princípios básicos e técnicas afins*. Interciência, Rio de Janeiro, 2003.
- NOGUEIRA, J. M. F. Mikhail S. Tswett: Um legado para a cromatografia moderna **Química**, v.100 p 51-56 jan/mar 2006 .
- O'CONNOR, D.; CLARKE, D. E.; MORRISON, D.; WATT, A. P. Determination of drug concentrations in plasma by a highly automated, generic and flexible protein precipitation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method applicable to the drug discovery environment
- PEREIRA, D. T. M. **Síntese, Caracterização Estrutural e Atividade Antiinflamatória de Derivados Tiazolidínicos e Imidazolidínicos**. 2003. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de antibiótico, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

PEREIRA, D. T. M. Síntese, Comprovação Estrutural e Atividade Antiinflamatória de Compostos Tiazolidinônicos-3,5-dissubstituídos. 2007. (Doutorado em Ciências Biológicas) departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON B.; RAGUVARA, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.785, p.263-275, 2003.

PRADO, Alexandre G. S.; FARIA, Elaine A.; PADILHA, Pedro M.. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, 2005.

PRADO, Alexandre G. S.; FARIA, A, Elaine. and PADILHA, Pedro M.. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química. Nova**. v.28, n.3, p. 544-547. 2005.

QUEIROZ, S. N. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76. 2001.

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

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Analysis of drug in biological samples: Automated “intube” solid-phase microextraction and High performance liquid chromatography. **Química Nova**, v.28. n.5, p.880-886. 2005.

RE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte andothelial cell interaction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 19:2094-104. 1999

RIBANI, Marcelo *et al* . Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et Biophysica. Acta** 1771 926-935, 2007.

- RUTA, J.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.), Comparison of columns packed with porous sub-2 μm particles and superficially porous sub-3 μm particles for peptide analysis at ambient and high temperature. **Journal of Separation Science**, v.33, p.2465–2477, 2010.
- SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and typ II diabetes. **Diabetes**. v.45, p. 1661-1669. 1996.
- SANTOS, I. B. V. **Sínteses e Atividades Antiinflamatória e Antinociceptiva de Novas Tiazolidinadionas**. 2009. (Mestrado em Ciências Biológicas). Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Universidade federal de Pernambuco, Recife. Brasil.
- SANTOS, L. C.; UCHÔA, F. T.; MOURA, R. O.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BAERBE, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. **Heterocyclic Communications**, v.11, p.121-128, 2005.
- SHAH. V. P.; MIDHA, S. K; FINDLAY, J. W. A *et al.* Bioanalytical Method Validation: A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.12, 2000.
- SHULMAN, A. I.; MANGELSDORF, D. J. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. **N Engl J Med**; 353:604-61.2005
- SILVA, A. L. M. *et al* . Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 2007.
- SILVA, César R. et al . Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.
- SNAYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2^a ed. Wiley Interscience, New York, 1997.
- SOARES, L.V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Editora Manole, 2006, 337 p.
- SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC–ESI–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.35, p.913-920, 1991.
- SRIPALAKIT, P.; NEAMHOM, P.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**. v 843, p 164-169, 2006.
- STIENSTRA, R.; MANDARD, S.; TAN, N. S.; WAHLI, W.; TRAUTWEIN, C.; RICHARDSON, T. A.; LINCHTENAUER-KALIGIS, E.; KERSTEIN, S.; MULLER, M.

The interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPAR α in liver. **J. Hepatol.** v.46, p.869-877, 2007.

SUN, N.; LU, G.; LIN, M.; FAN, G.; WU. High-throughput quantification of a novel thiazolidinedione MCC-555 in rat plasma by ultra-fast liquid chromatography and its application in pharmacokinetic studies. **Talanta**.v. 78, p, 164-169, 2006.

SUN. N.; LU, G.; LIN. M.; FAN.Y. G.; High-throughput quantification of a novel thiazolidinedione MCC-555 in rat plasma by ultra-fast liquid chromatography and its application in pharmacokinetic studies. **Talanta**, v.78, p.506-512, 2009.

SUN A .N.; LIN, M.; FAN, G.; HONG, Z.; LU, G.; Quantitative determination of MCC-555, a novel insulin sensitizer in beagle dog plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 835, p. 35–39, 2006.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description, **J. Comput. Aid. Mol. Des.**, v.19, p.453. 2005

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) based on functionalized inorganic oxid surfaces. *Química Nova*, v.25, n.4, p.616.623, 2002.

VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>, 2005.

VINOD, S. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY J. P.; YACOBI, A.; L, THOMAS.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 588-592. 1992.

WANG, P.; ANDERSON, P. O.; CHEN, S.; PAULSSON, K. M.; SJOGREN H. O.; LI, S. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. **Int. Immunopharmacol.** v.1, p. 803-812. 2001.

WATT, A. P.; MORRISON, D.; LOCKER, K. L.; EVANS, D. C. Higher Throughput Bioanalysis by Automation of a Protein Precipitation Assay Using a 96-Well Format with Detection by LC-MS/MS. **Anal. Chem.** v.72, p. 979–984, 2000.

with liquid chromatography. **journal of chromatography A**, v.856, p.3-54, 1999.

- YANG, X. Y.; WANG, L. H.; CHENT T.; HODGE D. R.; RESAU, J. H.; DASILVA, L; FARRAR W. L. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-associations with transcription factor NFAT. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 4541-4544. 2000.
- YKI-JARVINEN, H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 351, 1106-1118. 2004.
- YU. J.; MS., Ma, K.; JIN, G.; WANG, Y.; FANG, S.; LI, G.; Bioequivalence and Comparison of Pharmacokinetic Properties of 4-mg Tablet Formulations of Rosiglitazone Hydrochloride and Rosiglitazone Maleate: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Period Crossover Study in Healthy Adult Male Chinese Volunteers. *Clinical Therapeutics.* v. 30, n.12, 2008.
- ZHAO, W.; SUN, G.; ZHANG, J.; STRONG, R.; SONG. W.; GONZALES, N.; GROTTA, J. C.; ARONOWSKI, J. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in microglia/macrophages. *Ann. Neurol.* 61 (4), p. 352-362. 2007.
- ZINGARELLI, B.; COOK, A. JAMES.; Peroxisome Proliferator-activated Receptor-g is a New Therapeutic Target in Sepsis and Inflammation, *Shock*, v.23, n.5, p. 393-399. 2005

10-ANEXO

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 01 de março de 2010

Ofício nº 242/10

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Maria Bernadete de Sousa Maia**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 024803/2009-18

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE UM DERIVADO TIAZOLIDÍNICO (3-(2-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno) EM PLASMA DE RATOS WISTAR"**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento de fisiologia e farmacologia;
Animais: Ratos Wistar; machos e fêmeas;
Número de animais previsto no protocolo: 16

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidenta do CEEA



CCB: Integrar para desenvolver