

CAPÍTULO IV

***MÉTODO QUIRAL DE LC-UV PARA QUANTIFICAR O
ACETATO DE ESLICARBAZEPINA E OS
SEUS METABOLITOS EM MATRIZES
BIOLÓGICAS DE MURGANHO***

1. INTRODUÇÃO

O método cromatográfico descrito no capítulo III foi desenvolvido e validado para determinar o ESL e os seus principais metabolitos na matriz de plasma humano. No entanto, o objectivo primário desta dissertação era a caracterização farmacocinética do ESL e dos seus principais metabolitos em murganhos, com a certeza porém de que esta informação permitirá esclarecer alguns aspectos relacionados com os fenómenos de disposição destes compostos no homem. Para tornar exequível o objectivo proposto, procedeu-se ao desenvolvimento e à validação de um método enantioselectivo de LC-UV capaz de quantificar o ESL e os seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC nas matrizes de plasma, cérebro, fígado e rim de murganho (ALVES *et al.*, 2007b).

De facto, para que os resultados analíticos obtidos sejam fidedignos têm de ser gerados por métodos desenvolvidos e validados na mesma matriz biológica das amostras a analisar. Por isso, antes da aplicação de um determinado método analítico ter-se-á de proceder à respectiva validação na mesma espécie animal e em cada uma das matrizes a estudar (HUBERT *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 2000). Neste contexto, o método quiral de LC-UV previamente desenvolvido para quantificar o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano, não poderia ser directamente aplicável à determinação daqueles compostos em amostras de murganho. No entanto, os conhecimentos adquiridos durante o processo de desenvolvimento daquele método permitiram agilizar o desenvolvimento e a validação do método de LC-UV para quantificar o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC nas matrizes de murganho.

Neste capítulo, de modo a evitar a repetição desnecessária de conteúdos, não é feita uma abordagem teórica às orientações internacionais que guiam o processo de validação dos métodos cromatográficos em bioanálise. Efectivamente, este assunto já foi discutido no capítulo anterior, por isso aqui apenas se pretende apresentar os procedimentos e os resultados analíticos referentes aos parâmetros de fiabilidade estudados na validação do método em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fármacos e Reagentes

Os fármacos e os reagentes usados no desenvolvimento e validação do método cromatográfico que aqui se apresenta são comuns àqueles referidos na *secção 2.1* do capítulo III.

2.2 – Matrizes Biológicas

As matrizes brancas de plasma, cérebro, fígado e rim de murganho isentas dos analitos de interesse, usadas durante os ensaios de desenvolvimento e validação do método cromatográfico, foram obtidas a partir de murganhos CD-1, machos, adultos (30-35 g), provenientes da Harlan-Interfauna (Barcelona, Espanha) e mantidos em armários-biotério ventilados, com ciclos de luz-obscuridade de 12 h e com temperatura controlada. Durante o período de alojamento os murganhos tiveram livre acesso a água e a dieta padronizada para roedores (4RF21, Mucedola, Itália).

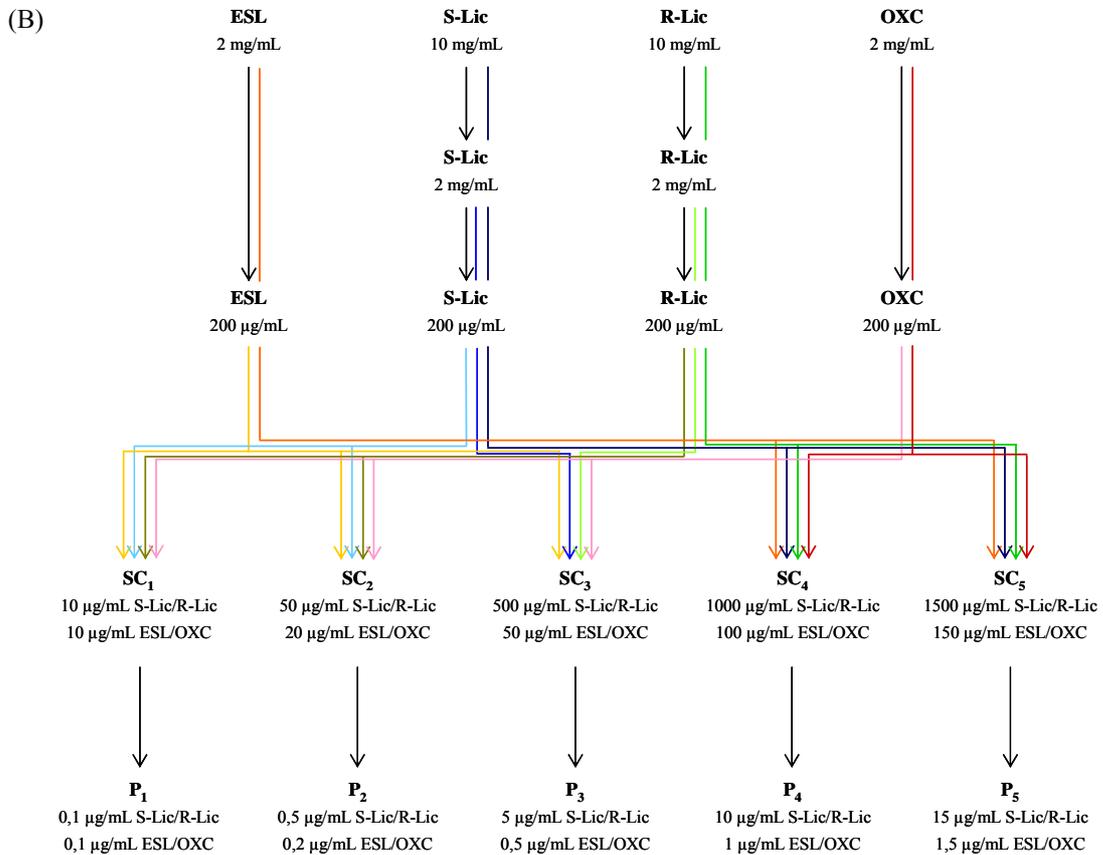
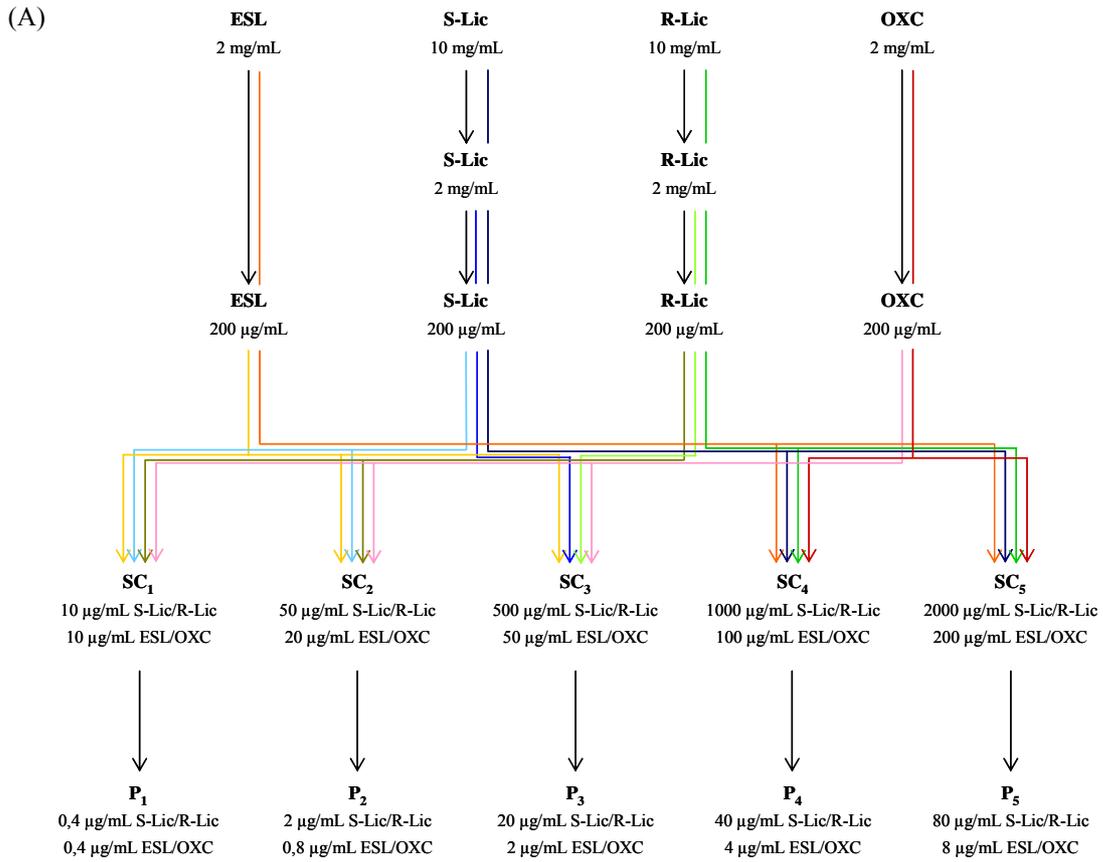
Os murganhos usados para a obtenção das matrizes brancas não foram sujeitos a qualquer tratamento farmacológico. As amostras de sangue foram recolhidas para tubos heparinizados, após deslocamento cervical e imediata decapitação. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm/10 min (4°C) e o plasma foi separado e armazenado a -30°C. Após a exsanguinação, o cérebro, o fígado e os rins foram rapidamente removidos, pesados e homogeneizados (1 g/4 mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 5). Os homogeneizados obtidos foram centrifugados a 4800 rpm/15 min (4°C) e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -30°C.

A experimentação animal foi conduzida em conformidade com a Directiva Europeia (86/609/EEC) para a protecção dos animais utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos e todos os procedimentos foram aprovados pela Direcção-Geral de Veterinária.

2.3 – Soluções *Stock*, Padrões de Calibração e Amostras de Controlo de Qualidade

As soluções *stock* de ESL (2 mg/mL), S-Lic (10 mg/mL), R-Lic (10 mg/mL), OXC (2 mg/mL) e Pi (1 mg/mL) foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas de cada um destes compostos em acetonitrilo. Estas soluções foram diluídas no mesmo solvente de forma a obter soluções de S-Lic e R-Lic na concentração de 2 mg/mL e soluções de ESL, S-Lic, R-Lic e OXC na concentração de 200 µg/mL. Estas soluções individuais foram usadas para preparar soluções combinadas de fortificação contendo os quatro fármacos de referência nas concentrações de 10, 50, 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic, e de 10, 20, 50, 100, 150 e 200 µg/mL para o ESL e OXC. Também foi preparada uma solução de trabalho do Pi na concentração de 200 µg/mL por diluição apropriada da respectiva solução *stock*. Todas as soluções foram armazenadas durante um mês, protegidas da luz e a aproximadamente 4°C, com excepção da solução de trabalho do Pi cuja preparação foi diária.

Os padrões de calibração foram preparados por fortificação das matrizes brancas de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados dos diferentes tecidos. Os padrões foram preparados em plasma de murganho nas concentrações de 0,4, 0,8, 2, 4 e 8 µg/mL para o ESL e OXC e de 0,4, 2, 20, 40 e 80 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic; em sobrenadante dos homogeneizados de cérebro nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 1 e 1,5 µg/mL para o ESL e OXC e de 0,1, 0,5, 5, 10 e 15 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic; e em sobrenadante dos homogeneizados de fígado/rim nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 1 e 2 µg/mL para o ESL e OXC e de 0,1, 0,5, 5, 10 e 20 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic. Na figura IV.1 está esquematizada a preparação dos padrões de calibração nas matrizes biológicas referidas. As amostras de CQ foram preparadas, independentemente, em brancos das mesmas matrizes biológicas.



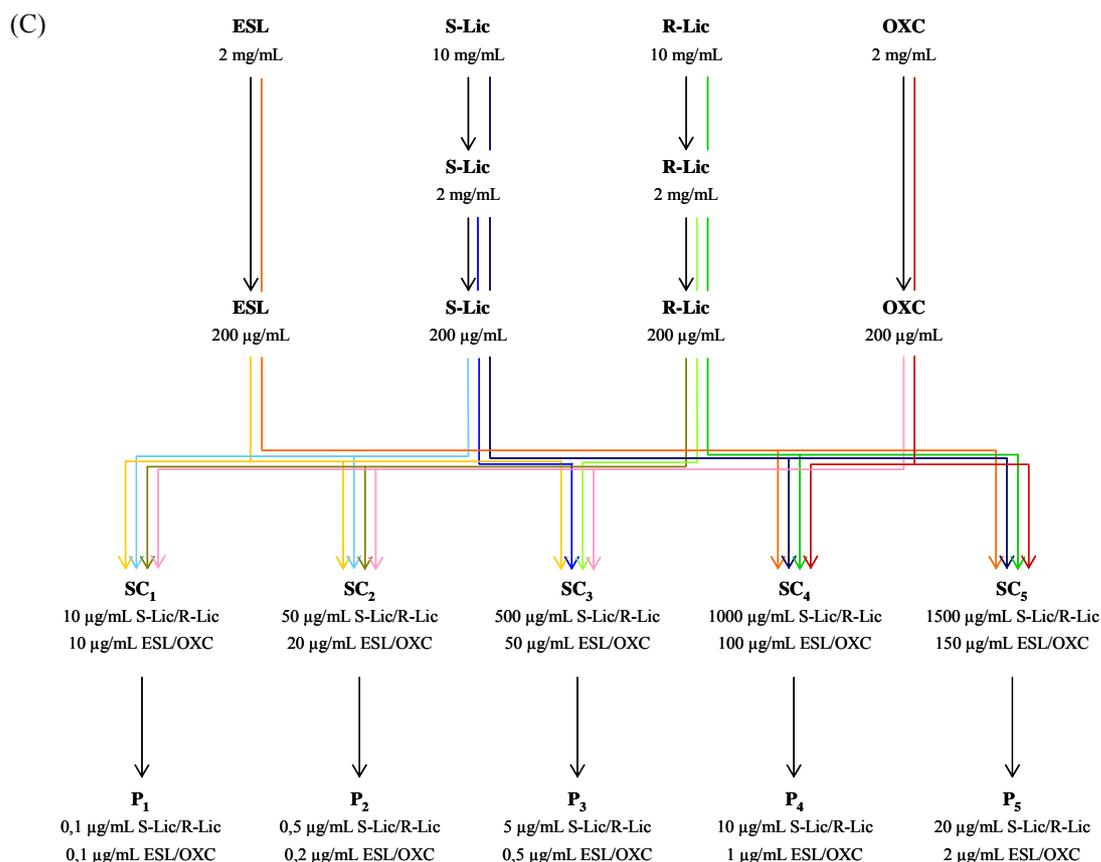


Figura IV.1 – Preparação dos padrões de calibração nas matrizes biológicas de murganho: (A) plasma, (B) sobrenadante do homogeneizado de cérebro e (C) sobrenadante do homogeneizado de fígado/rim.

2.4 – Preparação das Amostras

O procedimento empregue para a extracção do ESL, S-Lic, R-Lic, OXC e Pi das amostras de murganho foi a SPE, metodologia previamente usada para extrair os mesmos analitos das amostras de plasma humano (*secção 2.4* do capítulo III).

Aliquotas de 250 µL de plasma de murganho foram adicionadas a 750 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 5) fortificado com 10 µL da solução de trabalho do Pi. Após agitação no vórtex (10 s) a mistura foi transferida para um cartucho de extracção Waters Oasis[®] HLB (30 mg/1 mL; Waters, Milford, MA, USA), previamente acondicionado com 1 mL de metanol, 1 mL de acetonitrilo e 1 mL água-acetonitrilo (95:5, v/v). Uma vez eluída a amostra, os cartuchos foram submetidos a um vácuo de -30 kPa e lavados duas vezes com 1 mL de água e duas vezes com 1 mL de água-acetonitrilo (95:5, v/v). Após a secagem do adsorvente sob vácuo (-30 kPa, 5 min),

procedeu-se à eluição dos analitos com 1 mL de acetato de etilo, sob condições de vácuo ligeiro, e posterior secagem do adsorvente a -30 kPa (30 s). O eluato então obtido foi evaporado à secura sob uma corrente de azoto a 45°C e o resíduo seco reconstituído em 100 µL de fase móvel por agitação no vórtex (30 s) e ultra-sons (1 min). O extracto reconstituído foi transferido para um filtro de centrifuga Spin-X (0,22 µm) e filtrado por centrifugação a 13400 rpm/2 min, obtendo-se o extracto final pronto a injectar no sistema de LC.

Os sobrenadantes dos homogeneizados dos tecidos de murganho (cérebro, fígado e rim) foram descongelados e centrifugados a 13400 rpm/20 min, de forma a obter sobrenadantes claros. Aliquotas de 1 mL foram usadas para a análise após fortificação com 10 µL da solução de trabalho do Pi. De seguida, os analitos foram extraídos das amostras de sobrenadante pelo procedimento de SPE já descrito para as amostras de plasma, embora algumas diferenças tenham sido introduzidas nos passos de lavagem e nas condições de vácuo (-40 kPa). Atendendo à maior complexidade das matrizes de cérebro, fígado e rim, os cartuchos foram lavados com 1 mL de água e 1 mL de água-acetonitrilo (95:5, v/v), três ou quatro vezes, respectivamente em amostras de cérebro ou em amostras de fígado/rim. Os eluatos correspondentes foram processados do mesmo modo que os obtidos a partir das amostras de plasma.

2.5 – Equipamento e Condições Cromatográficas

O sistema de LC e as condições cromatográficas usadas na separação e quantificação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho foram aquelas descritas na *secção 2.5* do capítulo III.

2.6 – Validação do Método Quiral de LC-UV em Matrizes de Murganho

O método quiral de LC-UV desenvolvido para determinar quantitativamente o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho foi validado em conformidade com as orientações internacionais relativas à validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros de

fiabilidade estudados e os critérios de aceitação correspondentes foram comuns aos avaliados em plasma humano (*secção 2.6 do capítulo III*).

2.6.1 – Selectividade

A selectividade do método cromatográfico para quantificar o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, nas matrizes de plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho, foi avaliada pela análise de extractos ($n = 6$) das respectivas matrizes brancas provenientes de seis murganhos diferentes. A ausência de interferentes aos tempos de retenção dos analitos e do Pi indica que o método é selectivo.

2.6.2 – Curvas de calibração e limites de quantificação e detecção

A linearidade do método cromatográfico foi estudada para o ESL e OXC nas concentrações de 0,4-8 $\mu\text{g/mL}$, 0,1-1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1-2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente em plasma, cérebro e fígado/rim de murganho, e para os enantiómeros S-Lic e R-Lic nas concentrações de 0,4-80 $\mu\text{g/mL}$, 0,1-15 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1-20 $\mu\text{g/mL}$ nas respectivas matrizes referidas. As curvas de calibração foram preparadas em cinco dias diferentes ($n = 5$), por análise de cinco padrões de calibração obtidos por fortificação das matrizes brancas. As curvas de calibração foram construídas pela razão entre a altura do pico dos analitos e a altura do pico do Pi (resposta cromatográfica) *versus* as concentrações dos analitos adicionados às matrizes. Os dados foram sujeitos à análise de regressão linear ponderada, usando como factor de ponderação o inverso do quadrado da concentração ($1/x^2$), o qual foi seleccionado atendendo às curvas geradas e à soma em valor absoluto da percentagem de erro relativo.

O LQ do método para cada um dos fármacos a quantificar nas amostras de murganho foi avaliado, intra e interdia, em replicado ($n = 5$), na concentração mais baixa da respectiva gama de calibração: 0,4 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma de murganho, e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para os mesmos compostos em sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim. No LQ um CV que não exceda 20% e um *bias* dentro de $\pm 20\%$, respectivamente para a precisão e exactidão, são considerados aceitáveis.

O LD do método foi estimado para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em cada uma das matrizes de murganho consideradas, por diluições sucessivas do padrão de calibração de menor concentração. O LD estabeleceu-se na concentração mais baixa em que a razão sinal/ruído foi igual ou superior a 3.

2.6.3 – Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão foram estudadas, intra e interdia, em replicado ($n = 5$), através da análise de amostras de CQ em três concentrações diferentes representativas das gamas de calibração consideradas. As concentrações testadas foram 0,4, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,4, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma de murganho; 0,1, 1 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,1, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em sobrenadante de homogeneizado de cérebro; 0,1, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em sobrenadante de homogeneizados de fígado/rim. O critério de aceitação para a precisão foi um valor de CV que não exceda 15% (ou 20% no LQ) e para a exactidão um valor de *bias* dentro de $\pm 15\%$ (ou $\pm 20\%$ no LQ).

2.6.4 – Influência da diluição

A influência da diluição nas amostras de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados de fígado e rim de murganho foi investigada, na razão de 1:10, com amostras de CQ de concentrações apropriadas (40 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 400 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma; 10 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 100 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em sobrenadante dos homogeneizados de fígado e rim) de forma a assegurar que amostras de concentrações superiores à gama de calibração considerada possam ser diluídas com a matriz branca correspondente e quantificadas com precisão e exactidão aceitáveis. A precisão e a exactidão na diluição das amostras de CQ foram avaliadas, intra e interdia, em replicado ($n = 5$). O efeito da diluição não foi estudado no sobrenadante do homogeneizado de cérebro, pois os ensaios preliminares efectuados revelaram que as gamas de calibração estudadas no sobrenadante do homogeneizado de cérebro seriam suficientemente abrangentes para

compreender as eventuais concentrações cerebrais de ESL, S-Lic, R-Lic e OXC alcançadas com os estudos farmacocinéticos planeados.

2.6.5 – Recuperação

A recuperação dos analitos e do Pi a partir das amostras de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho foi estudada em três concentrações diferentes representativas das gamas de calibração consideradas, mediante análises em replicado ($n = 5$). As concentrações testadas foram 0,4, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,4, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma de murganho; 0,1, 1 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,1, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em sobrenadante de homogeneizado de cérebro; 0,1, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em sobrenadante de homogeneizados de fígado/rim. A recuperação do Pi também foi estudada nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ e de 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, nas matrizes de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados dos tecidos de murganho. A recuperação para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic foi estimada comparando a razão obtida entre as alturas dos picos fármaco/Pi nas amostras extraídas e nas soluções correspondentes não extraídas, as quais representam 100% de recuperação. A recuperação do Pi foi calculada pela razão entre as alturas dos picos do Pi obtidos em amostras extraídas e em soluções não extraídas.

2.6.6 – Estabilidade nas matrizes biológicas

A estabilidade do ESL e dos seus metabolitos foi avaliada nas matrizes de murganho de interesse, mediante a análise, em replicado ($n = 5$), de amostras de CQ em dois níveis de concentração (0,8 e 4 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 2 e 40 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma; 0,2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic no sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim). Os ensaios de estabilidade foram conduzidos durante 24 h a 4°C e durante 30 dias a -30°C, simulando as condições de manipulação e de armazenamento das amostras que antecederam a análise. A estabilidade foi estimada por comparação

dos dados obtidos a partir das amostras de CQ analisadas antes (amostras de referência) e depois (amostras de estabilidade) de expostas às condições de estabilidade previamente mencionadas. Como critério de estabilidade estabeleceu-se que a diferença em percentagem entre os dados resultantes das amostras de estabilidade e de referência deve estar compreendida em $\pm 15\%$.

3. RESULTADOS

3.1 – Selectividade

A selectividade do método para a determinação quantitativa do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC nas matrizes de murganho foi demonstrada pela ausência de interferentes das próprias matrizes aos tempos de retenção do Pi e dos analitos. Nas figuras IV.2, IV.3, IV.4 e IV.5 são apresentados os cromatogramas típicos resultantes da análise de extractos de amostras brancas e fortificadas de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho.

Neste caso, no estudo da selectividade apenas foram consideradas as interferências endógenas das matrizes biológicas de interesse, não tendo sido incluídos ensaios com quaisquer outros compostos exógenos porque os estudos experimentais planeados para a aplicação deste método cromatográfico não requerem a co-administração de outros fármacos.

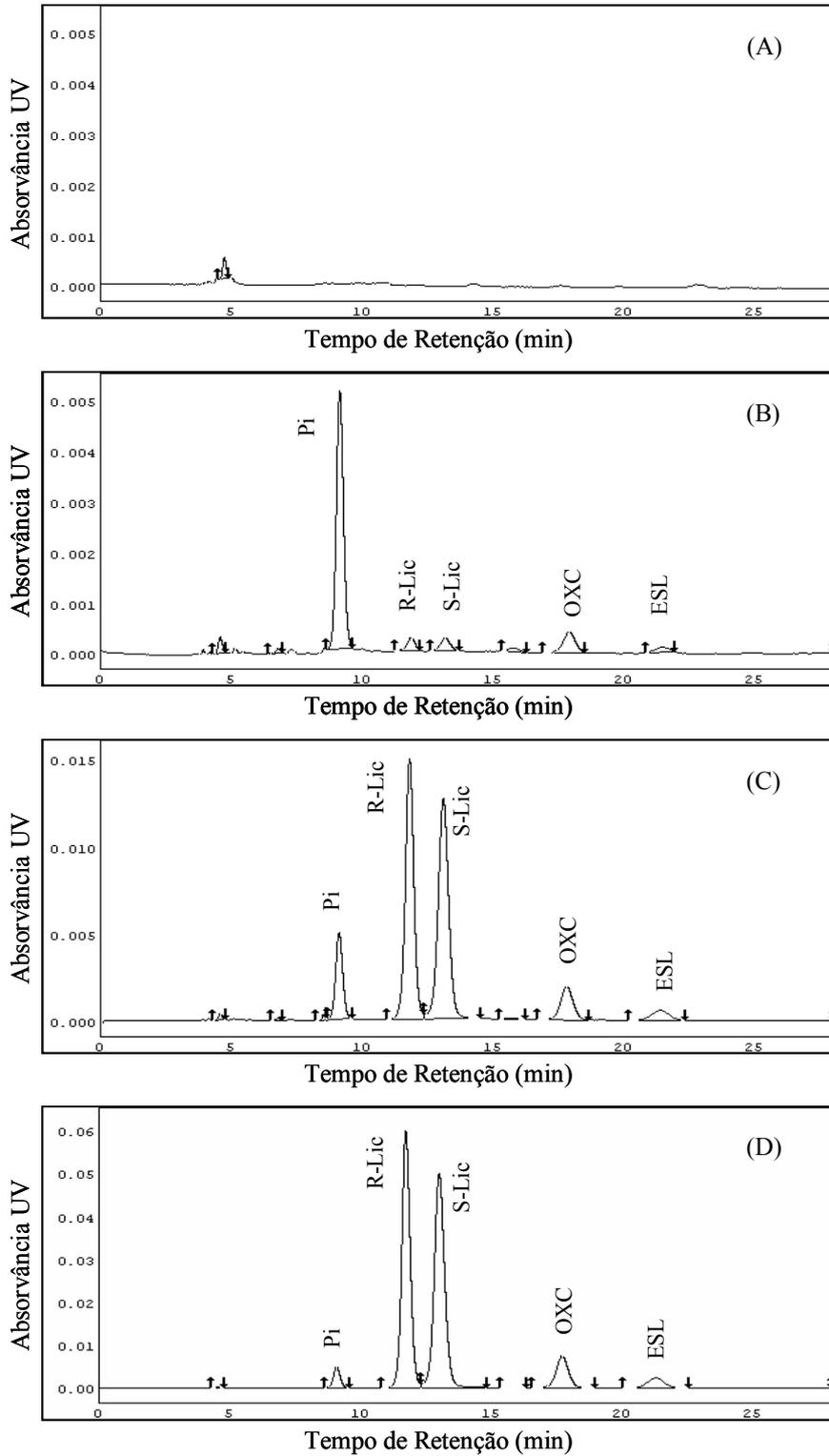


Figura IV.2 – Cromatogramas representativos de extractos de plasma de murganho: (A) branco; (B) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (0,4 µg/mL); (C) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic e S-Lic (20 µg/mL), OXC e ESL (2 µg/mL); (D) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic e S-Lic (80 µg/mL), OXC e ESL (8 µg/mL).

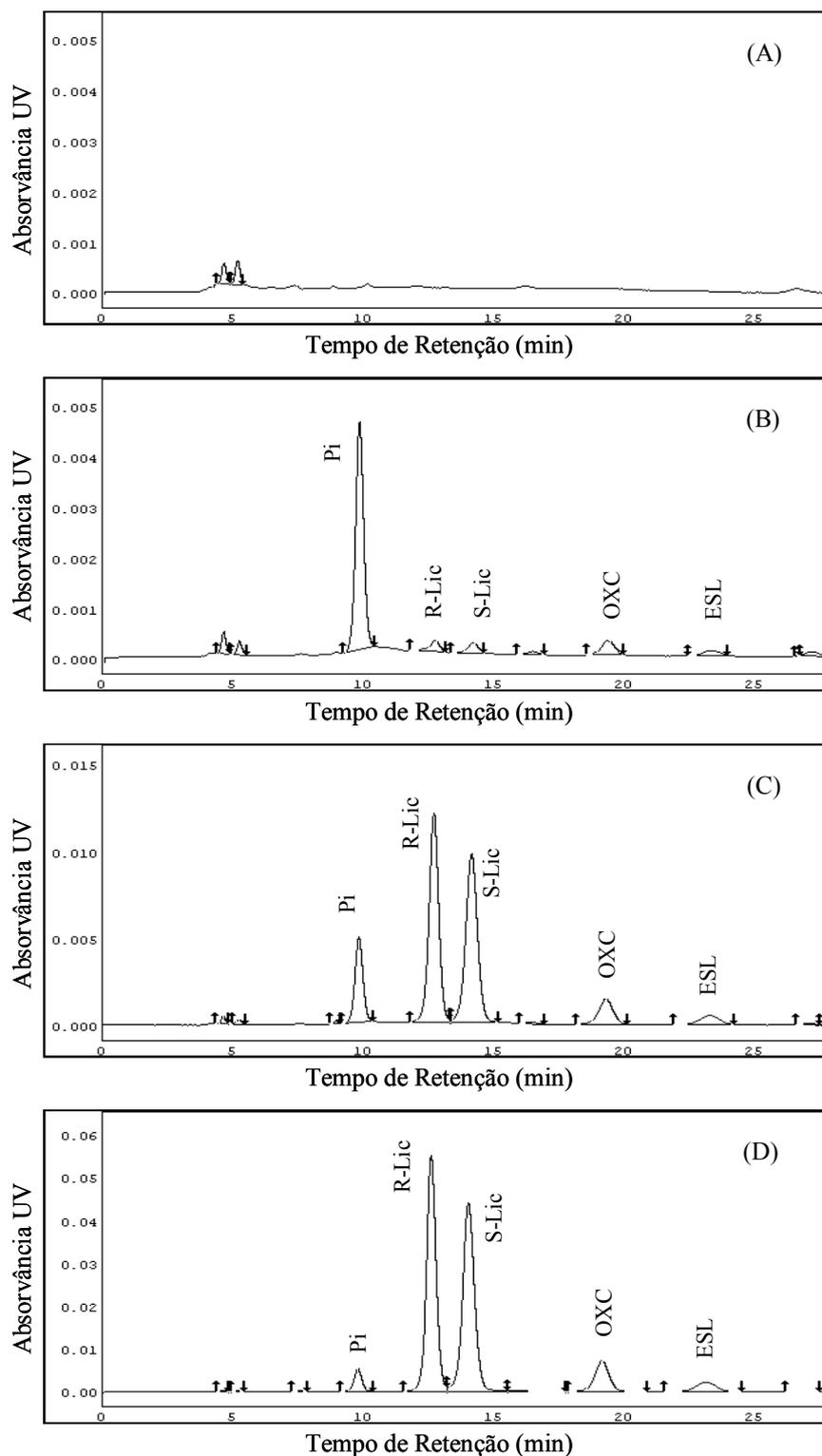


Figura IV.3 – Cromatogramas representativos de extractos de sobrenadante do homogeneizado de cérebro de murganho: (A) branco; (B) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (0,1 µg/mL); (C) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic e S-Lic (5 µg/mL), OXC e ESL (0,5 µg/mL); (D) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic e S-Lic (15 µg/mL), OXC e ESL (1,5 µg/mL).

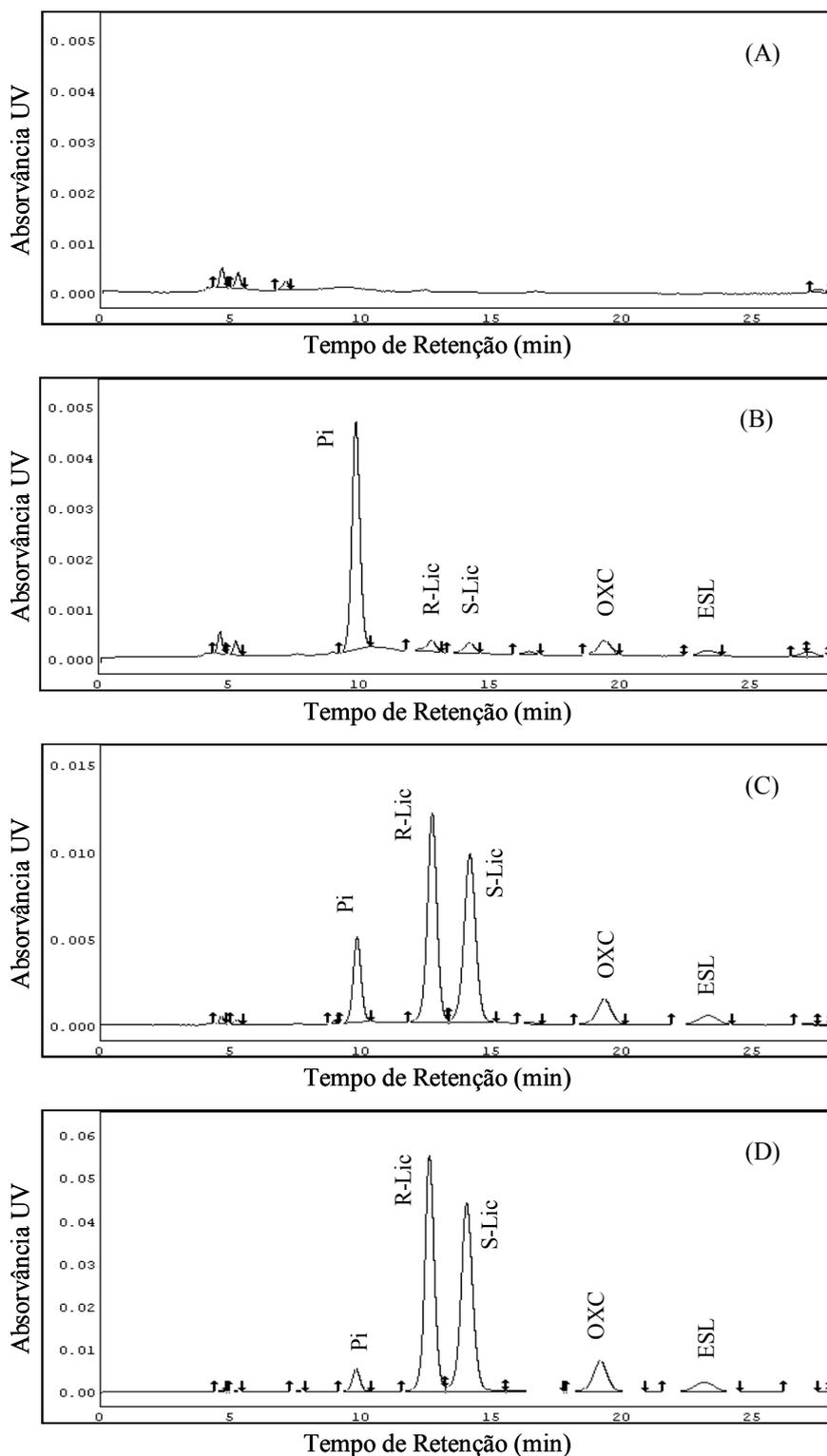


Figura IV.4 – Cromatogramas representativos de extractos de sobrenadante do homogeneizado de figado de murganho: (A) branco; (B) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (0,1 µg/mL); (C) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic e S-Lic (5 µg/mL), OXC e ESL (0,5 µg/mL); (D) fortificado com Pi (2 µg/mL), R-Lic e S-Lic (20 µg/mL), OXC e ESL (2 µg/mL).

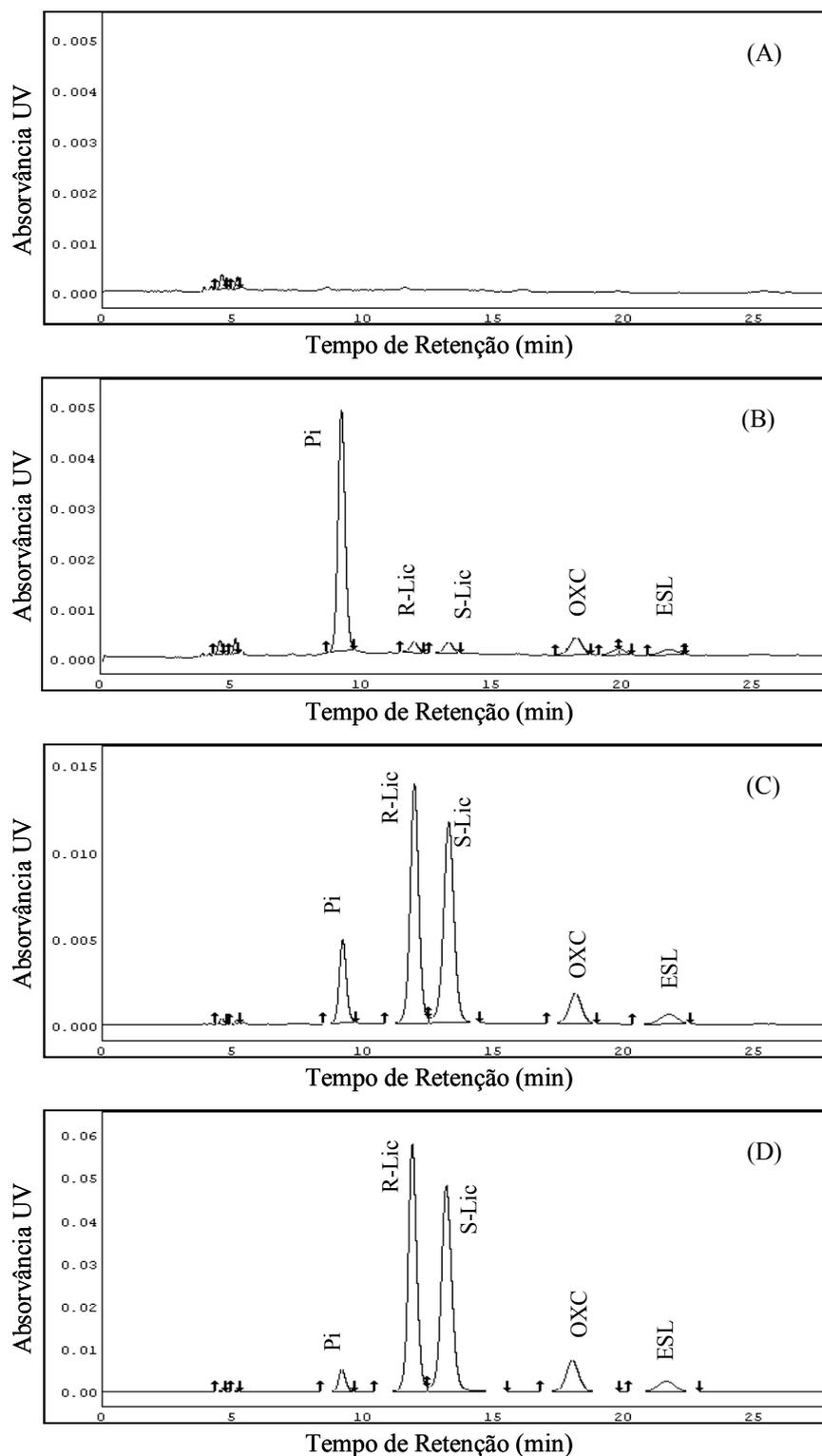


Figura IV.5 – Cromatogramas representativos de extractos de sobrenadante do homogeneizado de rim de murganho: (A) branco; (B) fortificado com Pi (2 $\mu\text{g/mL}$), R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (0,1 $\mu\text{g/mL}$); (C) fortificado com Pi (2 $\mu\text{g/mL}$), R-Lic e S-Lic (5 $\mu\text{g/mL}$), OXC e ESL (0,5 $\mu\text{g/mL}$); (D) fortificado com Pi (2 $\mu\text{g/mL}$), R-Lic e S-Lic (20 $\mu\text{g/mL}$), OXC e ESL (2 $\mu\text{g/mL}$).

3.2 – Curvas de Calibração e Limites de Quantificação e Detecção

As curvas de calibração construídas nas matrizes de murganho mostraram linearidade para o ESL e OXC de 0,4-8 µg/mL em plasma de murganho, de 0,1-1,5 µg/mL em sobrenadante de homogeneizado de cérebro e de 0,1-2 µg/mL em sobrenadante de homogeneizados de fígado e rim, e para cada um dos enantiómeros Lic nas concentrações de 0,4-80 µg/mL, de 0,1-15 µg/mL e de 0,1-20 µg/mL, respectivamente em plasma, cérebro e fígado/rim. As equações de regressão e os coeficientes de determinação (r^2) das curvas de calibração são apresentados na tabela IV.1. Os resultados demonstram uma boa linearidade para todos os analitos e em todas as matrizes estudadas ($r^2 \geq 0,996$).

Tabela IV.1 – Curvas de calibração para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma e em sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho (n = 5).

Matriz/Fármaco	Padrões calibração (µg/mL)	Equação de regressão ^a	r^2
Plasma			
ESL	0,4; 0,8; 2; 4; 8	$y = 0,0578x$	0,996
S-Lic	0,4; 2; 20; 40; 80	$y = 0,1201x - 0,0004$	0,998
R-Lic	0,4; 2; 20; 40; 80	$y = 0,1425x - 0,0062$	0,998
OXC	0,4; 0,8; 2; 4; 8	$y = 0,1786x + 0,0069$	0,996
Cérebro			
ESL	0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5	$y = 0,2295x - 0,0004$	0,998
S-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 15	$y = 0,4127x + 0,0016$	0,999
R-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 15	$y = 0,5178x + 0,0029$	0,999
OXC	0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5	$y = 0,6460x - 0,0071$	0,998
Fígado			
ESL	0,1; 0,2; 0,5; 1; 2	$y = 0,2199x - 0,0008$	0,998
S-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 20	$y = 0,4186x + 0,0009$	0,999
R-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 20	$y = 0,5236x - 0,0030$	0,999
OXC	0,1; 0,2; 0,5; 1; 2	$y = 0,6726x - 0,0052$	0,998
Rim			
ESL	0,1; 0,2; 0,5; 1; 2	$y = 0,2025x - 0,0004$	0,999
S-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 20	$y = 0,4084x - 0,0013$	0,999
R-Lic	0,1; 0,5; 5; 10; 20	$y = 0,4952x - 0,0018$	0,999
OXC	0,1; 0,2; 0,5; 1; 2	$y = 0,6026x - 0,0056$	0,997

^a $y = bx + a$, em que x é a concentração do fármaco, expressa em (µg/mL), e y é a razão entre as alturas dos picos do fármaco/ π , expresso em unidades arbitrárias, b é o declive e a é a intersecção na origem.; r^2 , coeficiente de determinação.

O padrão de calibração de menor concentração foi considerado o LQ do método para cada um dos analitos de interesse nas matrizes estudadas (0,4 µg/mL ou 0,1 µg/mL usando, respectivamente, 250 µL de plasma ou 1 mL de sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim). O LD do método foi estabelecido em 0,1 µg/mL para o ESL e 0,04 µg/mL para a OXC, S-Lic e R-Lic em todas as matrizes.

3.3 – Precisão e Exactidão

Na tabela IV.2 são apresentados os dados intra e interdia relativos ao estudo da precisão e exactidão na determinação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho. Considerando a totalidade dos resultados obtidos, o valor do CV não ultrapassa 11,55% e o *bias* variou de -3,79% a 3,84%. Os valores destes parâmetros indicam que a precisão e a exactidão estão dentro dos limites aceitáveis, incluindo no LQ, em todas as matrizes estudadas. Portanto, o método é preciso e exacto para determinar o ESL e os seus principais metabolitos a partir de amostras de plasma, cérebro, fígado e rim de murganho.

Na análise do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em amostras diluídas (1:10) de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados de fígado e rim de murganho, os valores de CV foram inferiores a 5,00% e o *bias* variou de -2,94% a 1,35%, indicando uma boa precisão e exactidão na quantificação daqueles compostos nas amostras diluídas. Estes resultados revelam que uma diluição de 10 vezes com matriz branca poderá ser adequadamente aplicada se a concentração de uma amostra a quantificar exceder o limite superior da curva de calibração.

Tabela IV.2 – Precisão (% CV) e exactidão (% Bias) intra e interdia para a quantificação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma e em sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho (n = 5).

C _{Nominal} ^a	Ensaio								
	Intradia				Interdia				
	% CV	% Bias	% CV	% Bias	% CV	% Bias	% CV	% Bias	
Plasma	ESL		OXC		ESL		OXC		
	0,4	6,06	-3,53	4,66	-2,49	3,21	-2,59	4,17	-2,57
	4	2,05	-0,30	2,13	0,34	2,60	0,04	3,15	0,18
	8	1,99	-2,32	2,37	-1,73	3,49	-0,88	3,69	-1,34
	S-Lic		R-Lic		S-Lic		R-Lic		
	0,4	3,52	-0,84	3,14	-0,81	5,32	-1,31	3,76	-0,98
	40	2,73	0,25	2,70	0,73	3,40	-1,26	3,55	-0,35
	80	1,78	-2,77	1,67	-2,50	4,94	-2,60	5,03	-1,85
	Cérebro	ESL		OXC		ESL		OXC	
		0,1	7,63	0,10	4,21	1,62	11,55	-1,81	5,15
1		3,84	-2,06	2,82	-0,99	5,94	-3,00	6,38	-1,29
1,5		5,62	1,50	5,10	2,72	5,81	0,37	6,94	2,27
S-Lic		R-Lic		S-Lic		R-Lic			
0,1		4,93	0,20	4,31	-0,01	9,62	-0,02	9,79	-0,20
10		3,89	0,56	3,94	0,36	4,97	0,51	4,83	0,34
15		5,72	-0,13	5,77	-0,14	4,57	0,09	4,50	0,15
Fígado		ESL		OXC		ESL		OXC	
		0,1	3,76	-1,37	4,69	0,50	5,93	0,95	4,67
	1	1,61	-3,79	2,94	-1,57	2,12	0,65	3,73	1,01
	2	3,49	0,01	4,01	0,16	2,70	-0,59	1,01	0,76
	S-Lic		R-Lic		S-Lic		R-Lic		
	0,1	4,20	-0,01	5,73	-0,24	4,76	-0,11	5,96	-0,21
	10	1,80	0,57	1,88	0,46	3,20	1,15	3,09	1,29
	20	1,87	-0,96	1,88	-0,93	3,49	0,05	3,45	0,15
	Rim	ESL		OXC		ESL		OXC	
		0,1	7,71	1,94	9,70	3,84	8,89	0,99	7,17
1		1,75	3,35	3,27	3,30	3,32	1,21	5,65	0,69
2		2,85	-0,17	4,16	1,04	2,95	-0,03	2,95	1,79
S-Lic		R-Lic		S-Lic		R-Lic			
0,1		7,01	0,35	4,13	0,44	10,40	0,39	10,12	0,31
10		3,18	1,62	3,14	1,85	3,46	1,26	3,44	1,13
20		4,01	1,07	4,07	0,42	2,58	-0,22	2,54	-1,04

^a Concentração nominal (µg/mL).

3.4 – Recuperação

A recuperação do ESL, OXC e dos enantiómeros Lic a partir das matrizes de plasma e de sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho foi avaliada e os dados analíticos correspondentes são apresentados na tabela IV.3. Da análise dos resultados obtidos pode constatar-se que a recuperação média dos analitos é consistente nos intervalos de concentrações consideradas. Atendendo conjuntamente a todos os analitos em todas as matrizes estudadas, os valores da recuperação média variaram de 89,09% a 102,10% e os CV médios não apresentaram valores superiores a 6,18%. A recuperação do Pi também foi estimada nas mesmas matrizes biológicas e apresentou valores que variaram de 73,53% a 89,14%, com CV dentro de 5,77%.

Tabela IV.3 – Recuperação (%) do ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho.

C _{Nominal} ^a	n ^b	Recuperação (%)			
		Média		% CV	
Plasma		ESL		OXC	
0,4	5	95,07	3,57	92,14	5,43
4	5	97,96	2,30	96,67	2,06
8	5	95,11	2,86	91,04	3,37
	15	96,05	3,26	93,28	4,64
		S-Lic		R-Lic	
0,4	5	103,11	4,27	100,21	2,84
40	5	104,99	2,13	106,21	2,30
80	5	98,19	2,69	96,54	3,01
	15	102,10	4,23	100,99	4,79
Cérebro		ESL		OXC	
0,1	5	90,30	7,05	87,82	3,60
1	5	95,18	5,90	87,44	6,60
1,5	5	97,12	2,30	92,67	2,39
	15	94,20	6,18	89,31	5,22
		S-Lic		R-Lic	
0,1	5	95,71	3,32	98,77	6,10
10	5	94,74	5,77	95,73	5,80
15	5	98,57	3,13	99,25	2,91
	15	96,34	4,54	97,92	5,37
Fígado		ESL		OXC	
0,1	5	97,65	8,40	97,45	4,23
1	5	96,10	2,53	88,73	3,79
2	5	99,21	4,74	97,63	4,87
	15	97,65	5,92	94,60	6,18
		S-Lic		R-Lic	
0,1	5	97,42	6,85	95,46	5,21
10	5	97,13	3,49	97,89	3,39
20	5	97,59	3,54	98,13	3,46
	15	97,38	4,89	97,16	4,27
Rim		ESL		OXC	
0,1	5	93,22	4,53	90,36	3,48
1	5	93,85	3,16	88,00	2,66
2	5	91,60	3,30	88,91	2,19
	15	92,89	3,85	89,09	3,04
		S-Lic		R-Lic	
0,1	5	98,26	2,18	93,33	2,89
10	5	92,58	3,42	93,08	3,45
20	5	96,02	2,01	96,28	1,98
	15	95,62	3,56	94,23	3,21

^a Concentração nominal (µg/mL); ^b Número de amostras.

3.5 – Estabilidade

Os dados de estabilidade obtidos para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho são apresentados na tabela IV.

Tabela IV.4 – Estabilidade do ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho (n = 5).

Ensaio de estabilidade								
Diferença em relação à amostra de referência (%)								
Plasma	ESL		OXC		S-Lic		R-Lic	
C _{Nominal} ^a	0,8	4	0,8	4	2	40	2	40
4°C (24 h)	-46,13	-31,16	2,84	0,04	7,25	-0,75	-0,70	-2,86
-30°C (30 dias)	-9,80	-3,74	-1,79	-6,96	-9,15	-8,77	-7,99	-9,13
Cérebro	ESL		OXC		S-Lic		R-Lic	
C _{Nominal} ^a	0,2	1	0,2	1	0,5	10	0,5	10
4°C (24 h)	-6,02	-7,05	-3,91	-2,71	-6,84	-4,46	-6,04	-4,79
-30°C (30 dias)	-9,82	-12,67	-0,28	-7,59	-9,42	-8,44	-8,81	-9,59
Fígado	ESL		OXC		S-Lic		R-Lic	
C _{Nominal} ^a	0,2	1	0,2	1	0,5	10	0,5	10
4°C (24 h)	-1,39	2,34	6,14	6,47	1,06	2,03	0,40	1,76
-30°C (30 dias)	3,93	3,46	1,16	3,14	1,62	2,90	1,45	2,31
Rim	ESL		OXC		S-Lic		R-Lic	
C _{Nominal} ^a	0,2	1	0,2	1	0,5	10	0,5	10
4°C (24 h)	-22,10	-22,38	9,54	-1,52	8,43	2,92	5,25	1,42
-30°C (30 dias)	-5,56	-4,24	6,93	-10,87	-4,41	-8,29	2,60	-7,53

^a Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$).

A partir dos resultados alcançados foi observado que todos os analitos se mostraram estáveis a -30°C por 30 dias em todas as matrizes de murganho estudadas. Porém, os ensaios de estabilidade executados a 4°C durante 24 h indicaram a ocorrência de perdas significativas de ESL nas matrizes de plasma e de sobrenadante do homogeneizado de rim. Os restantes analitos (OXC, S-Lic e R-Lic) não apresentaram degradação significativa a 4°C durante 24 h.

Todavia, os dados referentes à instabilidade do ESL nas amostras de plasma e rim de murganho não comprometem a aplicação deste método, pois os estudos pré-clínicos e clínicos previamente realizados têm demonstrado que o pró-fármaco ESL é

rapidamente metabolizado *in vivo* e as concentrações remanescentes não são geralmente mensuráveis, mesmo mediante a aplicação de técnicas de LC-MS (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001, ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005).

3.6 – Aplicação do método

Para assegurar que o método quiral de LC-UV desenvolvido é apropriado para quantificar o ESL e seus metabolitos nas matrizes de plasma, cérebro, fígado e rim de murganho, esta técnica analítica foi aplicada a amostras reais após a administração oral de 500 mg/kg de ESL em dose única. O procedimento experimental consistiu em colher as amostras de interesse, plasma, cérebro, fígado e rins, 0,5 h após a administração do ESL, as quais foram imediatamente processadas e analisadas como descrito nas *secções* 2.2, 2.4 e 2.5. Na figura IV.6 estão representados os cromatogramas referentes à determinação dos metabolitos do ESL nas amostras de plasma, cérebro, fígado e rim nas condições experimentais definidas. A partir dos cromatogramas obtidos pode constatar-se que os enantiómeros R-Lic e S-Lic estão suficientemente separados apesar da discrepância nas respectivas quantidades formadas *in vivo* pela administração do pró-fármaco ESL em murganhos. No entanto, o enantiómero R-Lic só foi encontrado em quantidades mensuráveis no fígado (figura IV.6C), aparecendo nas restantes matrizes em concentrações BLQ. O ESL, por sua vez, não foi detectado, o que está em conformidade com os resultados decorrentes de ensaios prévios realizados em murganhos (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001).

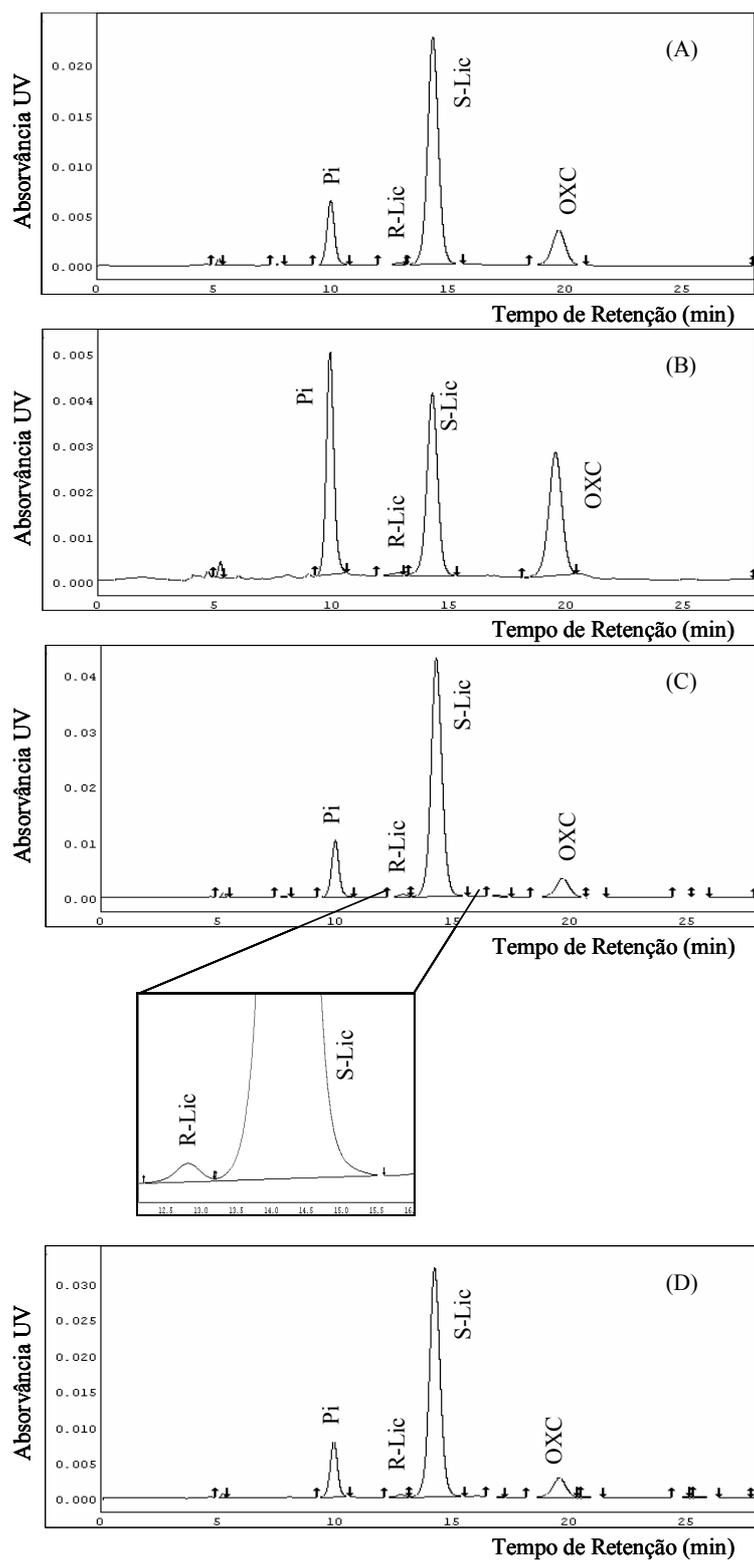


Figura IV.6 – Cromatogramas obtidos a partir de amostras de murganho 0,5 h após a administração oral de 500 mg/kg de ESL. As concentrações dos metabólitos do ESL encontradas foram as seguintes: (A) R-Lic (BLQ), S-Lic (31,0 $\mu\text{g/mL}$) e OXC (3,26 $\mu\text{g/mL}$) no plasma; (B) R-Lic (BLQ), S-Lic (1,91 $\mu\text{g/mL}$) e OXC (0,88 $\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante do homogeneizado de cérebro; (C) R-Lic (0,16 $\mu\text{g/mL}$), S-Lic (9,61 $\mu\text{g/mL}$) e OXC (0,48 $\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante do homogeneizado de fígado; (D) R-Lic (BLQ), S-Lic (8,73 $\mu\text{g/mL}$) e OXC (0,57 $\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante do homogeneizado de rim.

4. DISCUSSÃO

O método cromatográfico de LC-UV apresentado neste capítulo foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC no plasma e sobrenadante dos homogeneizados de cérebro, fígado e rim de murganho. Atendendo a que o objectivo central desta dissertação foi, desde sempre, o estudo da evolução das concentrações plasmáticas e tecidulares do ESL e dos seus metabolitos em murganhos, a técnica analítica aqui descrita constituiu a ferramenta basilar para a concretização de todos os estudos experimentais apresentados nos capítulos seguintes.

Este método cromatográfico contém, de facto, muitos pontos em comum com aquele previamente desenvolvido para a determinação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano. No entanto, a validação da técnica analítica em cada uma das matrizes de murganho tornou-se inevitável para assegurar a qualidade dos dados obtidos, pois para além de estar em causa a alteração da espécie, pretendia-se ainda quantificar o ESL e os seus metabolitos em matrizes de tecidos, as quais, pela sua complexidade, exigiram modificações aos procedimentos empregues na preparação das amostras de plasma. A confirmar a necessidade de se proceder ao estudo dos parâmetros de validação na mesma matriz biológica das amostras reais estão as diferenças encontradas na estabilidade do ESL nas amostras de plasma humano e de murganho armazenadas a 4°C por 24 h.

A sequência pela qual se procedeu ao desenvolvimento e validação das duas técnicas analíticas não foi aleatória, mas antes planeada de forma a sacrificar o menor número possível de murganhos para a obtenção de matriz biológica branca. Na verdade, todo o conhecimento adquirido durante os ensaios de desenvolvimento do método em plasma humano, componente do sangue em excedente nos bancos de sangue, permitiu acelerar o desenvolvimento nas matrizes de murganho e, conseqüentemente, reduzir as quantidades necessárias de matriz branca.

As amostras de murganho foram as seleccionadas para efectuar a validação deste método cromatográfico porque, de acordo com os dados pré-clínicos e clínicos disponíveis referentes à biotransformação do ESL e dos seus metabolitos, entre os pequenos animais de laboratório, o murganho parece ser, neste caso, o modelo experimental mais relevante para o homem (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001, ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005). Por outro

lado, as matrizes estudadas foram o plasma, o cérebro, o fígado e os rins por serem os principais tecidos de interesse de um ponto de vista farmacocinético.

O método enantioselectivo de LC descrito neste capítulo é, efectivamente, o único método cromatográfico totalmente validado que está publicado para a determinação quantitativa e simultânea do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC no plasma, cérebro, fígado e rim de murganho. Em termos práticos, esta técnica analítica combina características favoráveis, particularmente a separação directa dos enantiómeros numa coluna quiral, evitando as etapas de derivatização muitas vezes necessárias para a separação de enantiómeros, e a fase móvel usada é constituída essencialmente por água, o que torna os ensaios analíticos menos dispendiosos. Os resultados decorrentes dos ensaios de validação também demonstraram que o método é sensível, preciso, exacto e o procedimento de SPE desenvolvido possibilita uma boa selectividade e uma elevada recuperação dos analitos.

A disponibilidade deste método quiral de LC-UV em fase reversa para a quantificação dos principais metabolitos do ESL nas matrizes de murganho, suportará a realização de futuros ensaios experimentais *in vivo* para complementar os dados farmacocinéticos que serão gerados progressivamente a partir dos ensaios clínicos em curso para o ESL. Além disso, também constituirá uma ferramenta indispensável para esclarecer as vias metabólicas da OXC e dos enantiómeros S-Lic e R-Lic.