



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica

RAPHAEL DUTRA VALÉRIO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO DERIVADO
TIAZOLIDÍNICO (LPSF/AC-23) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL
EM PLASMA DE RATOS**

**Recife
2011**

RAPHAEL DUTRA VALÉRIO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO DERIVADO
TIAZOLÍDINICO (LPSF/AC-23) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL
EM PLASMA DE RATOS**

Dissertação a ser apresentada ao programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Sousa Maia

**Recife
2011**

Valério, Raphael Dutra

Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação quantitativa do derivado tiazolidinico (LPSF/AC-23) com atividade antitumoral em plasmas de ratos/ Raphael Dutra Valério. – Recife: O Autor, 2011.

114 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Bernadete Sousa Maia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2011.

Inclui bibliografia e anexo

1. Tiazolidina 2. Farmacologia 3. Farmacocinética I. Título.

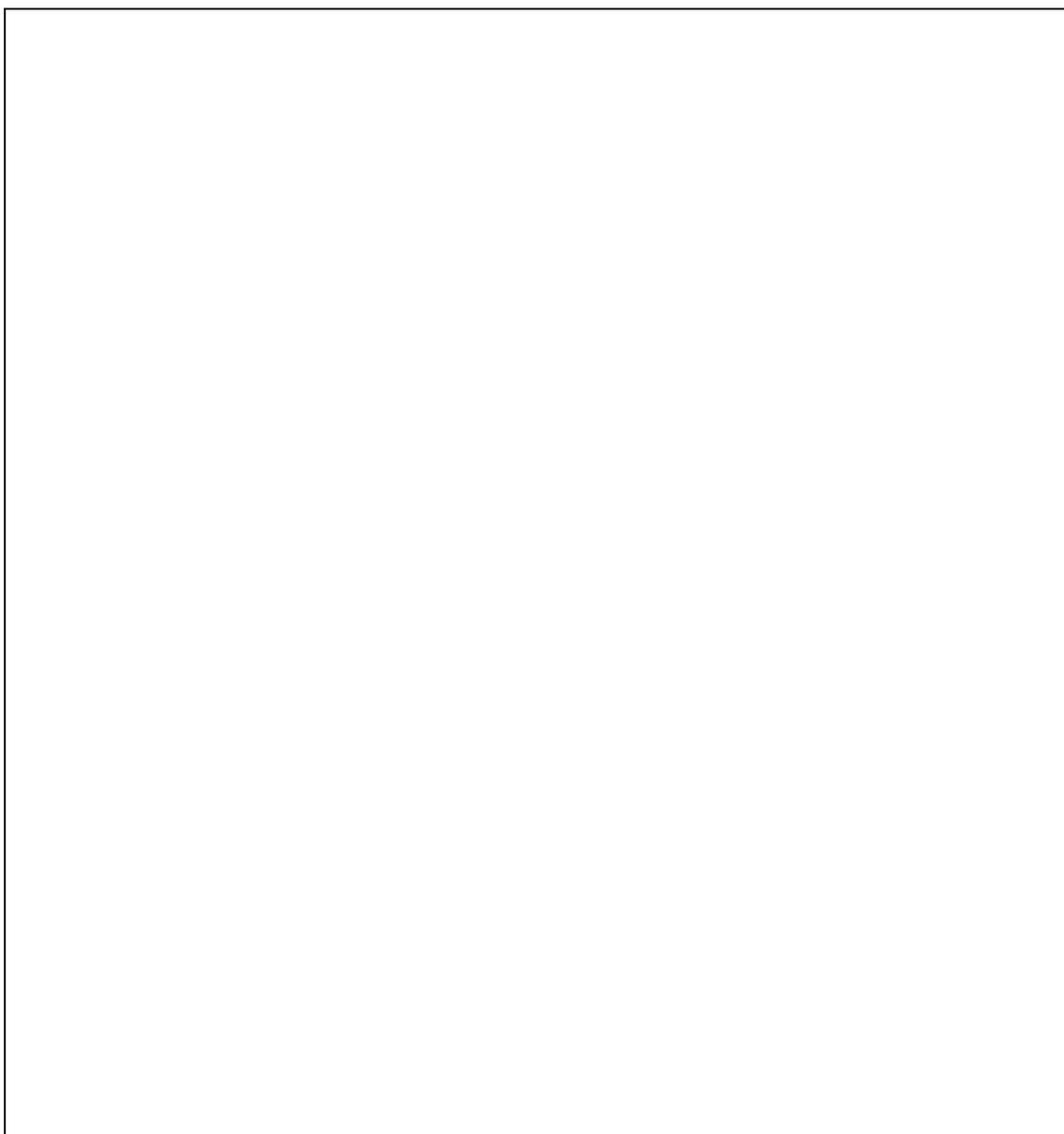
547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-230

Valério, Raphael Dutra.	Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação Quantitativa do Derivado Tiazolidínico (LP5F/AC-23) com Atividade Antitumoral em Plasma de Ratos		Mestrado PPGITUFPE 2010
----------------------------	--	--	-------------------------------

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof(a). Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof(a). Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Angela Maria Isidro de Farias

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra Ana Cristina de Almeida Fernandes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: VALÉRIO, Raphael Dutra

Título: Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação Quantitativa do Derivado Tiazolidínico (LPSF/AC-23) com Atividade Antitumoral em Plasma de Ratos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 30/09/2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ester Ribeiro Gouveia

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, por tudo que fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado esta oportunidade;

Aos meus pais pelo fundamental apoio concedido;

À minha esposa Bianca Valério pelo companheirismo, incentivo e paciência;

À Prof^a Dr^a. Maria Bernadete Souza Maia, pelos ensinamentos, incentivo e todo o apoio necessário;

Ao Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, em especial aos amigos Erivelton Franco, Rafaella Barreto e Ana Cássia;

Ao amigo Ricardo Martins, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida;

Aos colegas da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental, pela realização de análises importantes para a conclusão deste estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica – PPGIT;

À Universidade Federal de Pernambuco e aos docentes que contribuíram para minha formação.

EPÍGRAFE

*“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento;
pois melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata e
a sua renda melhor do que o ouro”
Rei Salomão em provérbios 3:13 e 14*

RESUMO

VALÉRIO, R. D. **Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação Quantitativa do Derivado Tiazolidínico (LPSF/AC-23) com Atividade Antitumoral em Plasma de Ratos**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O derivado tiazolidínico (LPSF/AC-23) sintetizado pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco apresentou importante atividade antitumoral em camundongos albinos Swiss. Tal resultado despertou o interesse e a necessidade do desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para determinação do LPSF/AC-23 em fluidos biológicos para possibilitar a posterior determinação dos parâmetros farmacocinéticos desta molécula candidata a fármaco. Neste 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 desta molécula em plasma de ratos. O método envolveu a preparação da amostra utilizando extração por precipitação protéica com acetonitrila e uma tiazolidinadiona (LPSF/GQ 113-B) foi utilizada como padrão interno (PI). A separação e quantificação do LPSF/AC-23 e PI foi realizada utilizando uma fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila/metanol/tampão fosfato 5 mM (pH 6,0) (55:30:15) eluída de forma isocrática através de uma coluna analítica Phenomenex[®] (C18, 5 μ m, 150mm x 4.6mm) a uma temperatura de 40°C e fluxo de 1mL/min. O comprimento de onda para detecção foi de 249 nm. A curva de calibração foi linear na faixa de 100-10000 ng/mL. A precisão intra e inter-dia apresentou valores de Desvio Padrão Relativo preconizados pela ANVISA, e a exatidão expressa pelo erro relativo (ER) variou de -3,49 a 7,67%. A recuperação foi de 92,25% para o analito e 89,67% para o PI. Desta forma, o método proposto pode ser aplicado para determinação quantitativa do LPSF/AC-23 em plasma de ratos em estudos farmacológicos, toxicológicos, farmacocinéticos e de biodisponibilidade.

Palavras-chave: Tioacridina. Antitumoral. LPSF/AC-23. CLAE-UV. Validação.

ABSTRACT

A thiazolidine derivative (LPSF/AC-23) synthesized by the Laboratory of Drug Synthesis and Planning of the Federal University of Pernambuco showed a significant antitumor activity in Swiss albino mice. This result aroused the interest and need for the development and validation of a bioanalytical method for determination of LPSF/AC-23 in biological fluids to allow the subsequent determination of pharmacokinetic parameters of this molecule drug candidates. In this context, a sensitive and selective bioanalytical method was developed and validated using the technique of high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet detector (HPLC-UV) for quantification of this molecule in plasma of rats. The method involved sample preparation using extraction by protein precipitation with acetonitrile and a thiazolidinedione (LPSF / QA 113-B) was used as internal standard (IS). The separation and quantification of LPSF/AC-23 and IS was performed using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile / methanol / 5 mM phosphate buffer (pH 6.0) (55:30:15) so eluted by isocratic an analytical Phenomenex ® column (C18, 5mm, 150mm x 4.6mm) at a temperature of 40 ° C and flow 1mL/min. The detection wavelength was 249 nm. The calibration curve was linear in the range of 100-10000 nm / mL. The intra and inter-day precision expressed by RSD values were recommended by the ANVISA, and accuracy expressed by relative error (RE) ranged from -3.49 to 7.67%. The recovery was 92.25% for the analyte and 89.67% for IS. Thus, the proposed method can be applied to quantitative determination of LPSF/AC-23 in rat plasma in pharmacological studies, toxicological, pharmacokinetic and bioavailability.

Keywords: Tioacridine. Antitumor. LPSF/AC-23. HPLC-UV. Validation

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Numero médio de anos potenciais de vida perdidos por câncer de todas as neoplasias malignas, por 1000 habitantes, Brasil, entre 1980 e 2007, partindo da premissa de que o limite superior é de 80 anos	22
TABELA 5.1 – Avaliação da solubilidade do LPSF/AC-23 em diferentes solventes/soluções	71
TABELA 5.2 – Variação do Tempo de Retenção (TR) do LPSF/AC-23 e do PI em função da temperatura	84
TABELA 5.3 – Variação do Tempo de Retenção (TR) do LPSF/AC-23 e do PI em função do pH	85
TABELA 5.4 – Precisão e Exatidão Intra-dia e Inter-dias da Curva Padrão	93
TABELA 5.5 – Equação da reta, coeficiente de correlação e coeficiente de determinação da curva de calibração representada na figura 5.28	94
TABELA 5.6 – Recuperação do LPSF/AC-23 e do Padrão Interno	95
TABELA 5.7 – Precisão e Exatidão na Quantificação do LPSF/AC-23	96
TABELA 5.8 – Estabilidade do LPSF/AC-23 no plasma de ratos Wistar e nas Soluções-Padrão sob diferentes condições de estocagem	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 1980 e 2007	21
FIGURA 1.2 – Esquema do processo de síntese do LPSF/AC-23	23
FIGURA 2.1 – Desenho em três dimensões gerado pelo programa Jmol da molécula LPSF-AC/23. Em destaque os anéis policíclicos planares	25
FIGURA 2.2 – Encaixe de uma acridina (N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida) entre os pares de bases do DNA. Figura em Jmol no formato de cartoon	26
FIGURA 2.3 – Redução da massa tumoral (sarcoma 180) sob ação dos compostos 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (A), 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (B) e 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (C).....	27
FIGURA 2.4 – Representação de uma separação cromatográfica. Os triângulos e círculos representam, respectivamente, o composto com maior e menor afinidade pela FE	29
FIGURA 2.5 – Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos)	41
FIGURA 2.6 – Determinação da massa/concentração de um componente desconhecido pelo método do padrão interno	47
FIGURA 5.1: Resultado gerado pelo <i>Chemicalize</i> indicando o valor de pKa, as microespécies iônicas que podem ser formadas e o seu equilíbrio na curva de pH.....	70
FIGURA 5.2 – Espectro de RMN H^1 da amostra contendo o composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona fornecida pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos	72
FIGURA 5.3 – Espectro de RMN H^1 da amostra contendo o composto 3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona fornecida pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos	73

FIGURA 5.4 – Espectro de Massa e Cromatograma da amostra do composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona na concentração de 7000ng/mL obtido por ESI, modo negativo, a 40°C, pelo LCMS –IT-TOF Shimadzu	74
FIGURA 5.5 – Espectro de Massa do PI na concentração de 300 ng/mL com aduto de uma molécula de acetolitrila, obtido por ESI, modo negativo, a 40°C, pelo LCMS –IT-TOF Shimadzu	75
FIGURA 5.6 – Cromatogramas da Varredura por Detector de Arranjo de Diodos da amostra contendo o composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona	76
FIGURA 5.7 – Cromatogramas da Varredura por Detector de Arranjo de Diodos da amostra contendo o composto 3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona	76
FIGURA 5.8 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Tampão Fosfato 5 mM (50:50 v/v)	77
FIGURA 5.9 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (50:50 v/v)	78
FIGURA 5.10 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (70:30 v/v)	78
FIGURA 5.11 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Tampão Fosfato 5 mM (85:15 v/v)	79
FIGURA 5.12 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (30:40:30 v/v/v)	79
FIGURA 5.13 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (40:40:20 v/v/v)	80
FIGURA 5.14 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (20:70:10 v/v/v)	80
FIGURA 5.15 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (30:60:10 v/v/v)	81
FIGURA 5.16 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (40:50:10 v/v/v)	81
FIGURA 5.17 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (50:40:10 v/v/v)	82

FIGURA 5.18 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (60:30:10 v/v/v)	82
FIGURA 5.19 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (70:20:10 v/v/v)	83
FIGURA 5.20 – Cromatograma da Corrida realizada utilizando como FM Metanol/ Acetonitrila / Tampão Fosfato 5 mM (30:55:15 v/v/v)	83
FIGURA 5.21 – Cromatograma da extração da amostra CQM (5000 ng/mL) pelo método da precipitação protéica por acetonitrila	86
FIGURA 5.22 – Cromatograma da extração da amostra CQM (5000 ng/mL) pelo método da precipitação protéica por metanol	87
FIGURA 5.23 – Cromatograma da extração da amostra CQM (5000 ng/mL) pelo método da precipitação protéica por ácido tricloroacético	88
FIGURA 5.24 – Cromatograma da extração da amostra CQM (5000 ng/mL) pelo método de extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente orgânico	89
FIGURA 5.25 – Cromatograma do plasma não contaminado extraído utilizando como FM Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (20:70:10), com fluxo de 1mL/min, temperatura de 40°C e pH 6,0	90
FIGURA 5.26 – Cromatograma do plasma não contaminado extraído utilizando como FM Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (55:30:15), com fluxo de 1mL/min, temperatura de 40°C e pH 6,0	91
FIGURA 5.27 – Cromatograma da amostra CQM (5000 ng/mL) obtido depois da definição de todos os parâmetros cromatográficos e do método de extração	92
FIGURA 5.28 – Curva padrão obtida pela injeção de soluções extraídas de plasma contaminado nas concentrações de 100, 250, 750, 1500, 3000, 6000 E 10000 ng/mL	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN** – Acetonitrila
- C₁₈** – Octadecilsilano
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CQA** – Controle de Qualidade de Alta concentração
- CQB** – Controle de Qualidade de Baixa concentração
- CQM** – Controle de Qualidade de Média concentração
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- EFS** – Extração em Fase Sólida
- ELL** – Extração Líquido-Líquido
- ER** – Erro relativo
- ESI** – Electrospray Ionization
- ETFIS** – Extração por Transição de Fase Induzida por Solvente
- FM** – Fase Móvel
- FE** – Fase Estacionária
- LC** – Cromatografia Líquida
- LC-MS –IT-TOF** – Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas cuja separação dos íons é por aprisionamento e tempo de voo.
- LC-MS** – Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas.
- LC-UV** – Cromatografia Líquida acoplada ao detector por radiação ultravioleta.
- LD** – Limite de Detecção
- LIQ** – Limite Inferior de Quantificação
- LPSF/AC-23** – (5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona)
- LPSF/GQ-113B** – (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona)
- pH** – Potencial Hidrogeniônico
- PI** – Padrão Interno
- RMN H¹** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- SM** – Solução Mãe
- ST** – Solução de Trabalho
- TR** – Tempo de retenção
- UV** – Ultravioleta

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	20
1.1 Relevância do tema	20
1.2 Justificativa do tema	24
II REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 A molécula	25
2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector UV (CLAE-UV)	28
2.3 Confirmação da pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS	30
2.4 Pré-validação : Condições Cromatográficas Ideais e Melhor Método de Extração	31
2.4.1 Fase Estacionária	31
2.4.2 Fase Móvel	32
2.4.3 Fluxo	35
2.4.4 Temperatura	36
2.4.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)	36
2.4.6 Método de Extração	37
2.5 Validação do Método: Definição da Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Recuperação	43
2.5.1 Seletividade	43
2.5.2 Linearidade	45
2.5.2.1 Método do Padrão Interno	45
2.5.3 Precisão	47
2.5.4 Exatidão	48
2.5.5 Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação	48
2.5.6 Recuperação	49
2.6 Estudos de Estabilidade do Analito em Matrizes Biológicas	50
2.6.1 Estabilidade de Curta Duração	50
2.6.2 Estabilidade de Longa Duração	50

2.6.3 Estabilidade Durante Ciclos de Congelamento e Descongelamento	51
2.6.4 Estabilidade das Soluções-padrão	51
III OBJETIVOS	52
3.1 Geral	52
3.2 Específicos	52
IV MATERIAS E MÉTODOS	53
4.1 Local de Realização do Estudo	53
4.2 O Derivado Tioacridínico, Padrão Interno e Reagentes Químicos	53
4.3 Obtenção da Matriz Biológica	53
4.4 Equipamentos	54
4.4.1 Sistema Cromatográfico	54
4.4.2 Aparelho para Obtenção de Água Ultra-pura	54
4.4.3 Balança de Precisão	55
4.4.4 Espectrômetro de Massas	55
4.4.5 Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H ¹)	55
4.5 Geração dos Descritores do LPSF/AC-23	55
4.6 Testes de Solubilidade	56
4.7 Confirmação da Identidade e Pureza da amostra do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por RMN H ¹	56
4.8 Confirmação da Pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS	56
4.9 Determinação do Comprimento de Onda com Máxima Absorção no Espectro Ultravioleta	57
4.10 Determinação das Condições Cromatográficas Ideais	57
4.10.1 Fase Estacionária	57
4.10.2 Fase Móvel	57
4.10.3 Temperatura	58
4.10.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)	59
4.10.5 Fluxo	59
4.11 Determinação do Melhor Método de Extração	59
4.11.1 Extração por Precipitação Usando Acetonitrila como Agente Precipitante ...	60
4.11.2 Extração por Precipitação Usando Metanol como Agente Precipitante	61

4.11.3 Extração por Precipitação Usando Ácido Tricloroacético como Agente Precipitante	62
4.11.4 Extração Líquido-Líquido (ELL)	62
4.12 Verificação da Seletividade do Método	63
4.13 Determinação do Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior	63
4.14 Construção da Curva de Calibração para Determinação da Linearidade do Método	63
4.15 Determinação da Precisão e Exatidão do Método	66
4.15.1 Precisão e Exatidão Intra-dia	66
4.15.2 Precisão e Exatidão Inter-dias	66
4.16 Determinação da Recuperação do Método	66
4.17 Determinação da Estabilidade do Analito na Matriz Biológica	68
4.17.1 Estabilidade Após Ciclos de Congelamento e Descongelamento	68
4.17.2 Estabilidade de Curta Duração	68
4.17.3 Estabilidade de Longa Duração	68
4.17.1 Estabilidade das Soluções-Padrão	69
V RESULTADOS	70
5.1 Descritores do LPSF/AC-23	70
5.2 Testes de Solubilidade	71
5.3 Confirmação da Identidade e Pureza da amostra do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por RMN H ¹	72
5.4 Confirmação da Pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS	74
5.5 Determinação do Comprimento de Onda com Máxima Absorção no Espectro Ultravioleta	76
5.6 Determinação das Condições Cromatográficas Ideais	77
5.6.1 Fase Móvel	77
5.6.2 Temperatura	84
5.6.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)	85
5.7 Determinação do Melhor Método de Extração	86
5.7.1 Extração por Precipitação Usando Acetonitrila como Agente Precipitante	86
5.7.2 Extração por Precipitação Usando Metanol como Agente Precipitante	87

5.7.3 Extração por Precipitação Usando Ácido Tricloroacético como Agente Precipitante	88
5.7.4 Extração Líquido-Líquido	89
5.8 Verificação da Seletividade do Método	90
5.9 Determinação do Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior	92
5.10 Verificação da Linearidade do Método	93
5.11 Recuperação do Método	95
5.12 Precisão e Exatidão do Método	96
5.13 Determinação da Estabilidade do Analito na Matriz Biológica e nas Soluções-Padrão.....	97
VI DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	98
6.1 Fase de Pré-Validação do Método: Definição das Condições Cromatográficas Ideais, Melhor Método de Extração e Estabilidade do Analito	98
6.2 Fase de Validação do Método: Verificação da Linearidade, Recuperação, Precisão e Exatidão	103
6.3 Aspectos Gerais do Método	103
REFERÊNCIAS	106
ANEXO	114
Anexo A: Folha de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)	114

I. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema

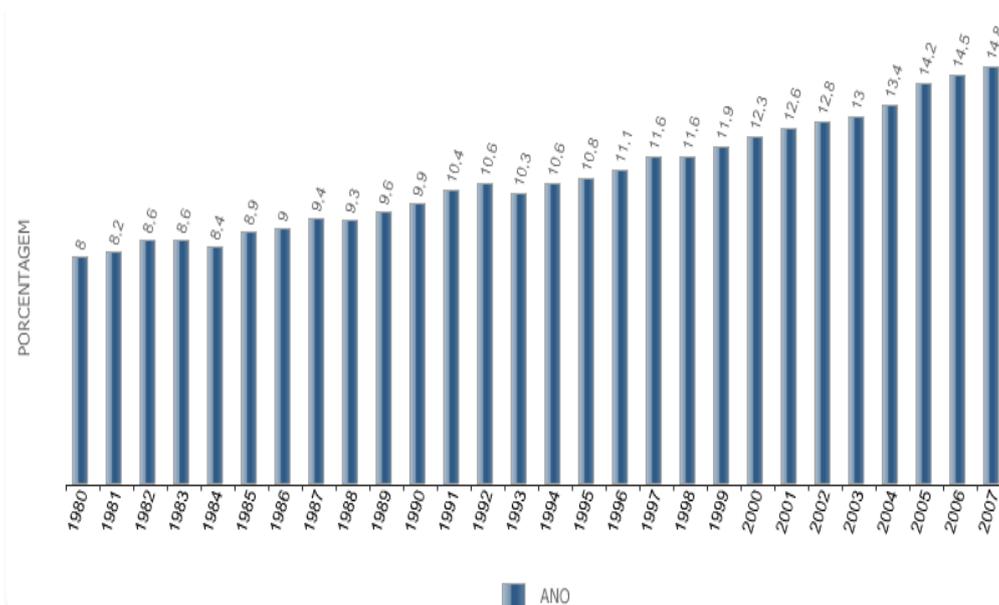
O homem há muito se incomoda em presenciar o sofrimento dos seus semelhantes e, na tentativa de minimizar esse fato, vem continuamente tentando criar meios para combater os principais males que o atingem, sejam na área física, psíquica ou econômica.

Neste contexto, já faz algum tempo que a patologia conhecida como “câncer” intriga a comunidade científica, principalmente os cientistas relacionados à área da saúde. Grandes esforços (laborais e financeiros) são feitos anualmente na tentativa de entender os mecanismos e fatores envolvidos na gênese e desenvolvimento desta doença no organismo humano.

O câncer se destaca como uma das principais doenças que afligem a população do mundo nos dias atuais. Para se ter um panorama da situação, em 2008 ocorreram 7,6 milhões de mortes devido a essa enfermidade, número que corresponde aproximadamente a 13% do total de óbitos registrados no mundo neste ano (OMS, 2011a). A previsão é que o número de novos casos da doença passe de 11,3 milhões para 15,5 milhões entre 2007 e 2030 e o número de óbitos causados por câncer no mundo aumente 45% no mesmo período, atingindo a impressionante marca de 11,5 milhões de mortes (OMS, 2011b).

Se forem analisados os dados dessa enfermidade no nosso país, percebe-se que o quadro é bem parecido, com essa doença sendo responsável por mais de 14% das causas de morte registradas (BRASIL, 2011), e a cada ano, com o envelhecimento da população, os números de óbitos causados pelo câncer tem aumentado como se pode observar na figura 1.1:

FIGURA 1.1: Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 1980 e 2007



Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM / MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de informação.

Como se pode observar na tabela 1.1, milhares de anos potenciais de vida foram perdidos nas últimas décadas por conta desta enfermidade (BRASIL, 2011), causando um grande sofrimento para a nossa população e uma grande perda econômica para o país, já que uma grande parte da população atingida se encontra na faixa etária economicamente ativa, causando assim uma diminuição da força de trabalho (COSTA-COUTO & NASCIMENTO, 2008). Somando-se a isso há também um grande gasto financeiro por parte do governo para o tratamento dos enfermos alocados em hospitais públicos.

TABELA 1.1: Numero médio de anos potenciais de vida perdidos por câncer de todas as neoplasias malignas, por 1000 habitantes, Brasil, entre 1980 e 2007, partindo da premissa de que o limite superior é de 80 anos

Faixa etária	APVP	TAPVP
01-04 anos	1.309.556	3,51
05-09 anos	1.212.497	2,58
10-14 anos	1.038.265	2,19
15-19 anos	1.295.867	2,87
20-29 anos	2.888.460	3,81
30-39 anos	5.279.164	8,77
40-49 anos	9.892.742	22,62
50-59 anos	12.334.560	42,42
60-69 anos	9.450.378	49,47
70-79 anos	2.538.060	25,64
Total	47.239.549	11,39

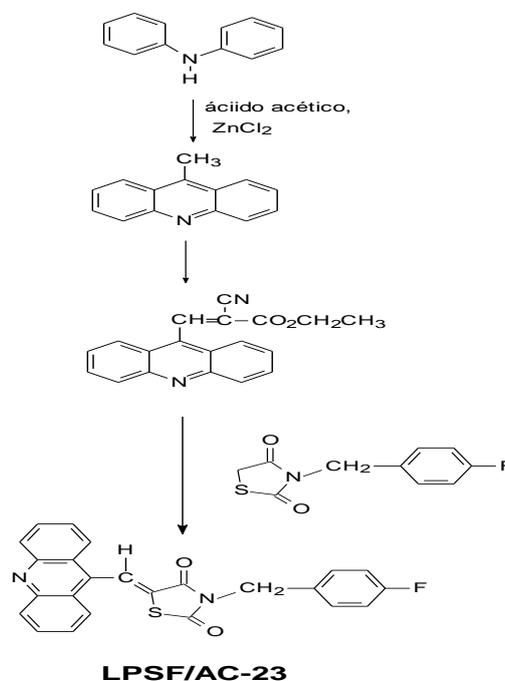
Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM / MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de informação. APVP – Anos Potenciais de Vida Perdidos; TAPVP – Taxa de Anos Potenciais de Vida Perdidos.

Na tentativa de melhorar o panorama acima descrito, a síntese orgânica moderna tem proporcionado um significativo aumento no número de substâncias sintéticas que vêm sendo empregadas como importantes agentes terapêuticos na espécie humana (VERMA & SARAF, 2008).

Segundo Korfmacher (2005) o processo de descobrimento de novas drogas sintéticas começa com a procura, entre uma gama de compostos, daquela que já apresenta alguma atividade terapêutica que interessa ao pesquisador. Então modificações estruturais são feitas na molécula original portadora da atividade biológica (ex. tiazolidina, imidazolidina, tiazacridinas), dando origem a uma série de derivados homólogos ou análogos, no intuito de aperfeiçoar a sua atividade ou minimizar os seus efeitos adversos. A esse método dá-se o nome de modificação ou variação molecular, onde o conceito de bioisosterismo é o mais utilizado (KOROLKOVAS, 1977; SILVA et al., 2004)

Com a aplicação de bioisosterismo se pode analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisóstero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser de ação idêntica ou mesmo antagônica (BARREIRO & FRAGA, 2001). Uma vasta literatura destaca a ampla e potente atividade biológica e farmacológica do núcleo tiazolidínico no tocante a propriedades cardiovasculares (SUZUKI et al., 1999), antimicrobiana (BONDE & GAIKWAD, 2004; BONDOCK et al., 2007), anti-helmíntica (BONSE et al., 1999), antimalárica (GIRAULT et al., 2000) antiinflamatória (SILVA, 2011; SANTOS, 2009; SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2003) e, o que mais interessa para esse estudo, a atividade anticâncer (CHAMDRAPPA et al., 2008), entre outras. Com relação ao núcleo acridínico, a literatura destaca a seu potente efeito antineoplásico (PIGATTO et al., 2001; SILVA, 2003; ARIMONDO et al., 2001). Nesse contexto, estudos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT) relacionados à síntese de novos fármacos sobre o núcleo imidazolidínico têm gerado promissoras moléculas, dentre essas o derivado 5-acridin-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AC-23) (Figura 1.4), que demonstrou significativa atividade antitumoral *in vivo* frente ao modelo de tumor sólido sarcoma 180 na dose de 46 mg/kg/dia.

FIGURA 1.2: Esquema do processo de síntese do LPSF/AC-23.



Fonte: SILVA, T. G. Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Derivados Acridino-tiozolidínicos e Acridino-imidazolidínicos. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.

Frente ao que foi dito, a relevância deste projeto está no fato do mesmo envolver o desenvolvimento e validação de método bioanalítico, etapa crucial na cadeia produtiva de fármacos, medicamentos e outros insumos estratégicos para a Saúde. Sua aplicabilidade é à base de estudos toxicológicos e farmacológicos (Pré-clínicos e clínicos) para uma correta interpretação e conclusões racionais de estudos relativos à segurança e eficácia farmacologia de novas moléculas candidatas a fármacos, podendo inclusive vir a gerar uma patente de um novo fármaco, ajudando assim a diminuir a desconexão (alta produção científica vs. baixo número de patentes) do Sistema de Inovação no setor da saúde no Brasil identificada por Chaves e Albuquerque (2006). Finalmente, o trabalho desenvolvido neste projeto contribuirá sobremaneira para maior consolidação dos Grupos de Pesquisa a ele associados, bem como nos projetará competitivamente, regional e nacionalmente, na área farmoquímica e biotecnológica.

1.2 Justificativa do tema

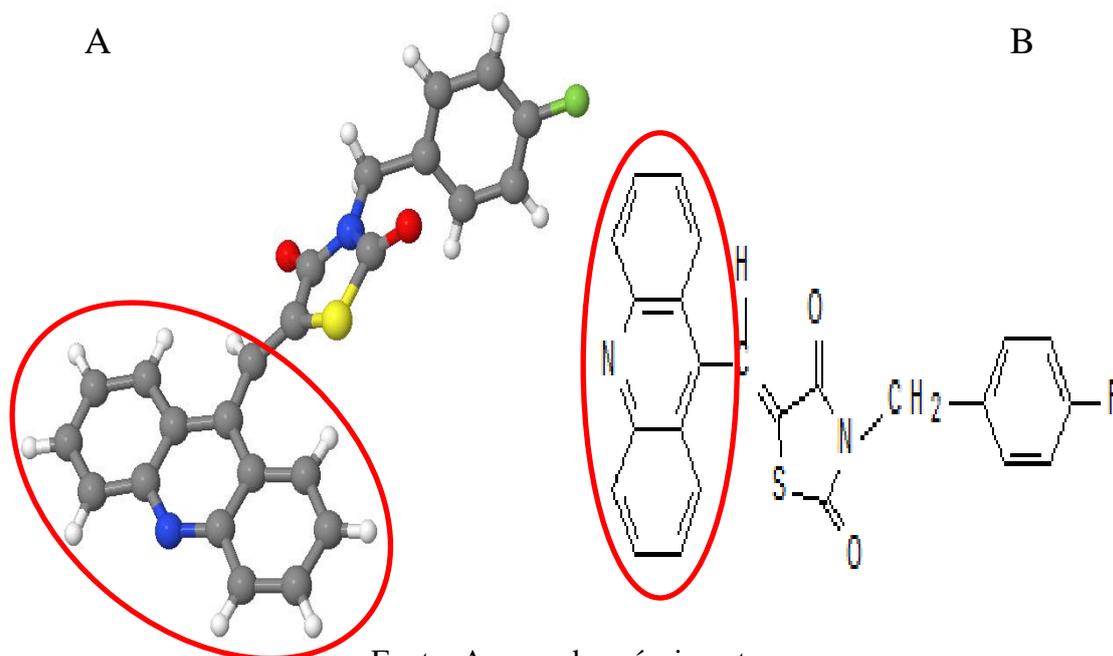
Considerando o potencial terapêutico desta molécula, o desenvolvimento de um método bioanalítico simples, seletivo, reprodutível e com sensibilidade adequada para determinação quantitativa do mesmo e/ou seus metabólitos nos fluídos biológicos, (plasma, soro, urina) é item indispensável na condução de estudos envolvendo seus aspectos farmacêuticos e farmacológicos (pré-clínico e clínico). Métodos envolvendo cromatografia líquida em fase reversa são considerados como métodos de escolha para análise de fármacos por várias razões tais como sua ampla aplicabilidade e compatibilidade com soluções aquosas e orgânicas, bem como com diferentes sistemas de detecção (ultravioleta, fluorimétricos, eletroquímicos, espectrométrico, espectrômetro de massa) (MAIA et al., 2007 e 2008). Neste estudo, é proposto desenvolver e validar um método analítico envolvendo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de Ultravioleta (LC-UV), que autorize uma determinação direta do LPSF/AC-23 em fluídos biológicos. Uma vez assegurados os critérios de fidedignidade relativos aos parâmetros analíticos (sensibilidade, precisão, exatidão, linearidade), bem como as condições ótimas para sua aplicação o método aqui proposto poderá, então, ser considerado apropriado para determinação do perfil farmacocinético do LPSF/AC-23. Este projeto é parte de um projeto de pesquisa maior intitulado: **“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS DE COMPOSTOS BIOATIVOS”**.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Molécula

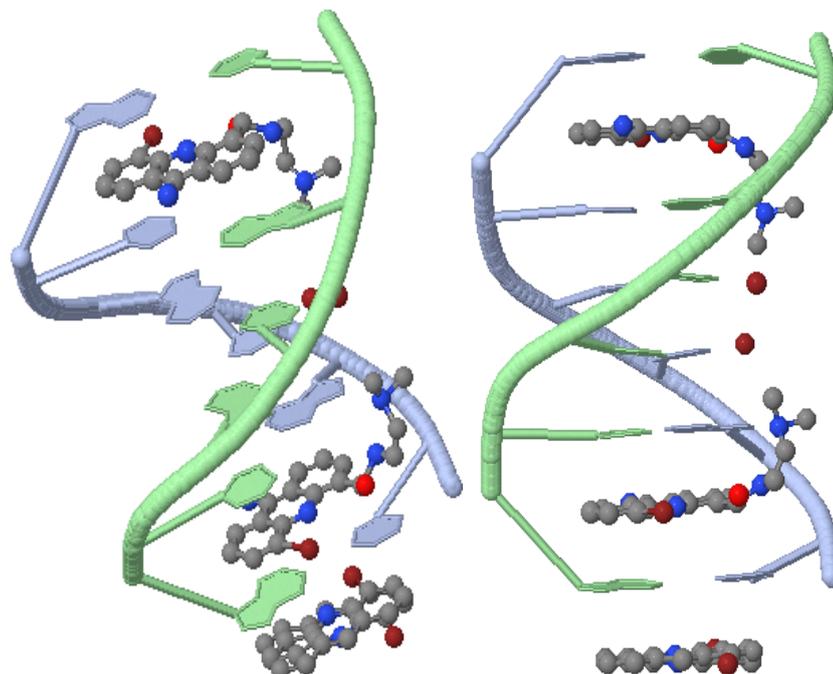
A molécula foco deste estudo, como pode ser observado na Figura 2.2, é uma tiazacridina. A atividade terapêutica dessa classe de compostos vem da sua habilidade de ligar-se ao DNA, intercalando-se entre os pares de bases e bloqueando as enzimas topoisomerase I e II (importantes na divisão celular) (PIGATTO et al., 2011; ARIMONDO et al., 2001; JAYEWARDENE et al., 1997; LERMAN, 1963 e 1961). Esses mecanismos interferem na estrutura e na integridade funcional do genoma para alterar ou impedir o processo vital da progressão celular, promovendo a morte da célula cancerígena. A Figura 2.1 mostra a perspectiva no espaço do LPSF-AC/23, onde se pode visualizar claramente os enrijecimentos estruturais da molécula (principalmente nos anéis aromáticos policíclicos planar) que se acredita serem fundamentais para que a molécula tenha a capacidade de se intercalar ao DNA e exercer sua atividade antitumoral (DIZIEGIELEWSKI et al., 2002). Já a Figura 2.2 é uma imagem obtida por cristalografia de raio x que mostra um derivado acridínico “encaixado” entre os pares de bases do DNA, ilustrando o mecanismo de ação das acridinas.

FIGURA 2.1: Desenho em três dimensões gerado pelo programa Jmol (A) e fórmula estrutural (B) da molécula LPSF-AC/23. Em destaque os anéis policíclicos planares.



Fonte: Acervo do próprio autor

FIGURA 2.2: Encaixe de uma acridina (N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida) entre os pares de bases do DNA. Figura em Jmol no formato de cartoon.

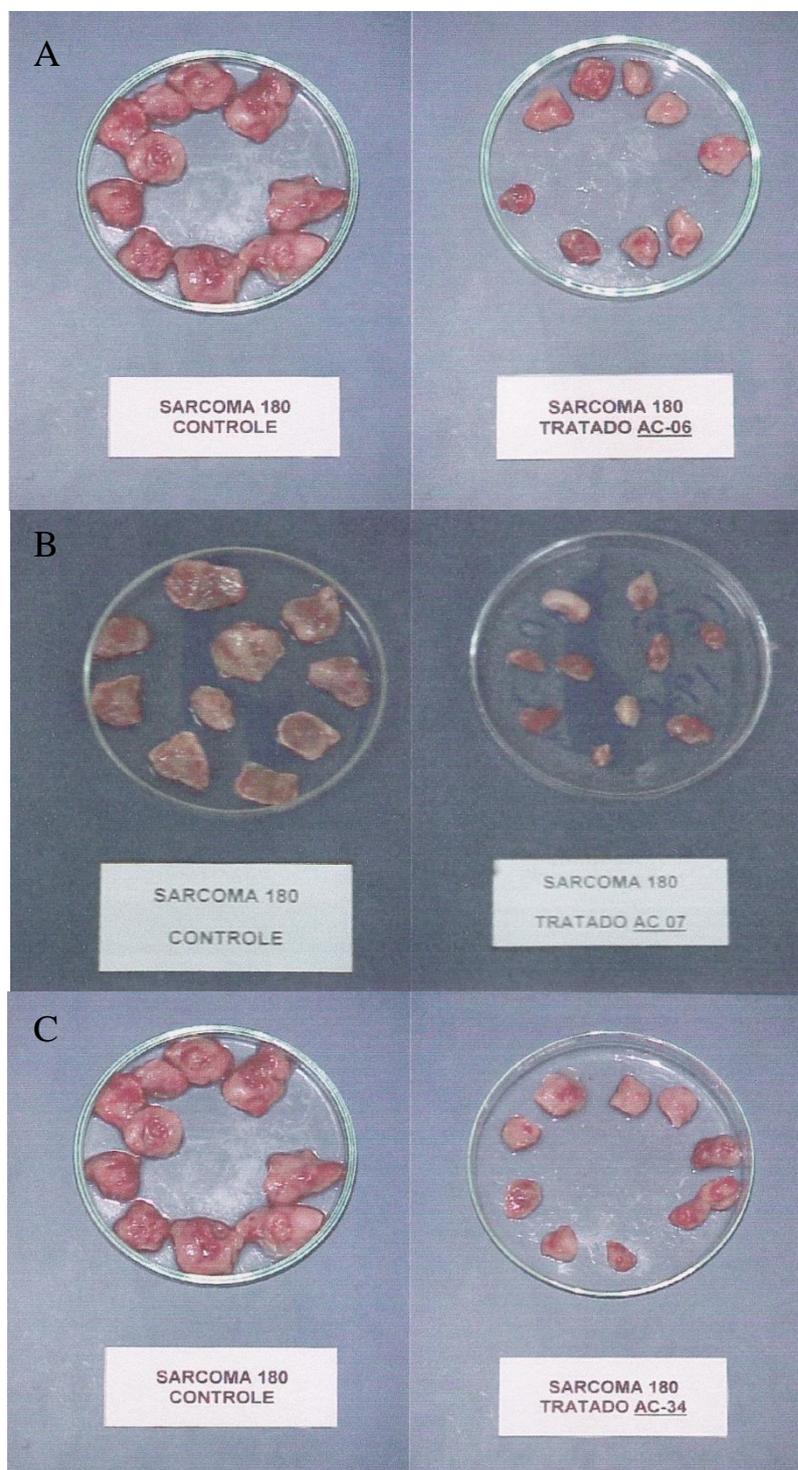


Fonte:.. Extraída do site www.pdb.org (código PDB: 367d)

Ainda com relação ao grande potencial antitumoral dessa classe de moléculas, tem-se o importante estudo o desenvolvido por Silva (2003), que demonstrou a significativa atividade antitumoral das tiazacridinadionas frente aos tumores malignos sarcoma 180. O trabalho mostrou que nos animais tratados com essa classe de moléculas a massa tumoral quando extirpada apresentou alterações macroscópicas importantes quando comparados ao grupo controle. Os tumores apresentaram aspecto esbranquiçado e pobre vascularização, com caráter pouco invasivo e bem limitado, desenvolvendo-se para a camada superficial (intradérmica) com aderência na epiderme. Além disso, os órgãos dos animais não apresentaram metástases. Já a massa tumoral do grupo controle apresentou caráter invasivo, expansivo e rica vascularização.

A figura 2.3 mostra a redução da massa tumoral sob a ação de alguns dos compostos pertencentes a essa classe química (tiazacridinas):

FIGURA 2.3: Redução da massa tumoral (sarcoma 180) sob ação dos compostos 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (A), 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (B) e 5-(acridina-9- ilmetileno)-3-(4-fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (C).



Fonte: SILVA, T. G. Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Derivados Acridino-tiozolidínicos e Acridino-imidazolidínicos. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2003.

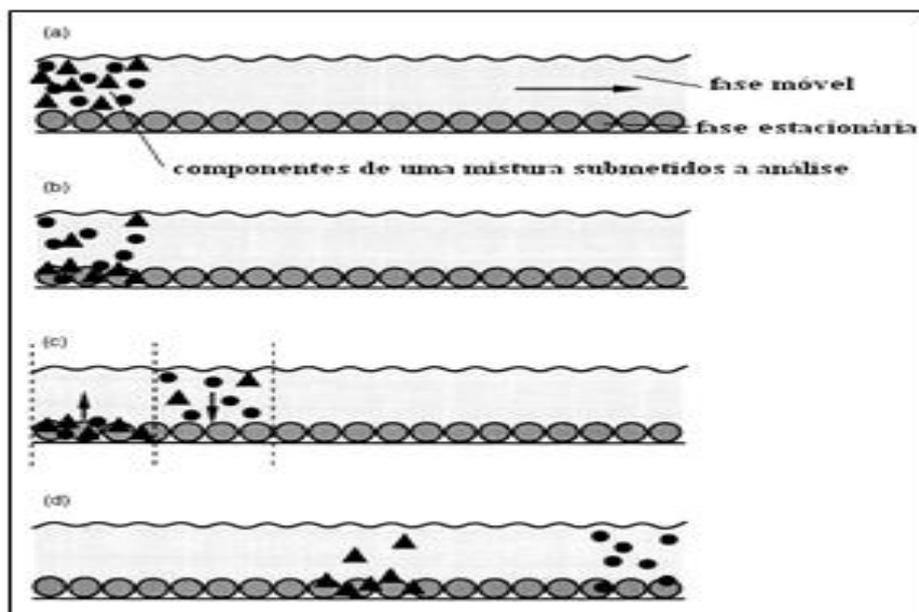
Por se tratar de uma molécula nova, é importante saber o valor de alguns descritores (como o *LogP* que expressa a solubilidade da molécula e o *pKa* que serão de extrema importância na orientação em relação a parâmetros que terão de ser definidos durante o decorrer deste estudo. Para gerar esses descritores, será usado um banco de dados reconhecido na comunidade científica, e o mais indicado (pois existem outros como, por exemplo, o VCCLab) quando se quer estimar o valor de *LogP* e *pKa* de uma molécula: o “*Chemicalize*” da ChemAxon. Usando um software de modelagem molecular, inserimos dados como a fórmula e estrutura molecular do LPSF-AC/23 e então pede-se para ele calcular os descritores da molécula.

2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector UV (CLAE-UV)

Este estudo está baseado em uma técnica analítica largamente utilizada para a quantificação de moléculas bioativas nos fluidos biológicos: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para um melhor entendimento do que será desenvolvido, um breve resumo dessa técnica será feito a seguir.

A Cromatografia Líquida é um método físico-químico de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: fase móvel (líquido) e fase estacionária (fixa, colocada em uma coluna) (SOARES, 2006; LANCAS, 2009). Segundo Meyer (2004), essa migração diferencial ocorre como repetidas etapas de sorção e desorção durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária e devido às diferenças nos coeficientes de distribuição individual de cada analito da amostra, ocorre a separação dos componentes (figura 2.4). A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

FIGURA 2.4: Representação de uma separação cromatográfica. Os triângulos e círculos representam, respectivamente, o composto com maior e menor afinidade pela FE.



Fonte: Adaptado de MEYER, 2004.

Depois de separados, estes compostos precisam ser então detectados para que possam ser analisados qualitativamente ou quantitativamente. O sistema cromatográfico pode ter vários tipos de detectores, sendo os mais utilizados os detectores por Índice de Refração, Fluorescência, Espectrometria de Massas e Ultravioleta (UV). Este último, por ser relativamente seletivo, apresentar custo razoável e ser prático, ainda é o detector mais utilizado na análise de compostos presentes em matrizes biológicas complexas (KAZAKEVICH & LOBUTO, 2007; SOARES, 2006).

Na detecção por UV (que é o detector que será usado neste estudo) o comprimento de onda deve ser selecionado de maneira que o analito e o padrão interno (PI) (caso seja utilizado) tenham uma absorbância máxima, permitindo assim uma maior seletividade e sensibilidade do método. Para a seleção do comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima é preciso submeter à amostra a uma varredura de frequências de onda que passem do ultravioleta até o visível, e o espectro, na forma de gráfico, indicará o melhor comprimento de onda para se trabalhar (SILVA, 2011).

Atualmente a CLAE é a técnica de separação mais utilizada nos laboratórios, devido à praticidade nas determinações quantitativas e a grande parcela de produtos sujeitos a análise. A versatilidade quanto à adequação do equipamento para a troca de

fases estacionárias, fases móveis, variações de fluxo, temperatura, pH, entre outras condições, permite que o método tenha ampla aplicabilidade em diversos ramos da ciência como: análise de alimentos, fitoterapia, toxicologia, bioanálise, proteoma, genoma, etc (SILVA, 2011).

2.3 Confirmação da pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS

Antes de serem iniciadas as corridas cromatográficas para a definição das condições cromatográficas ideais, é necessária a confirmação da identidade do pico cromatográfico do LPSF/AC-23 e do PI, ou seja, se os picos que estão sendo observados no cromatograma gerado pelo aparelho de CLAE tratam-se realmente dos compostos de interesse. Para isso, uma das técnicas mais comuns utilizadas, pela fidedignidade dos dados gerados, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) (KORFMACHER, 2005; SOARES 2006).

A espectrometria de massas ioniza um composto puro que tenha sido previamente isolado por cromatografia líquida, gasosa ou outro método qualquer. Esse processo de ionização pode ser brando ou não. Se a ionização for branda, o íon gerado e analisado pelo detector tem a mesma massa do composto original acrescido ou diminuído da massa de um próton (este íon é chamado de *íon molecular*). Se a ionização for mais forte, a molécula presente na amostra se fragmenta gerando íons com massas menores do que a molécula original ai então o aparelho coleta e separa os fragmentos dotados de carga elétrica de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), fornecendo ao analista um espectro da abundância relativa de cada fragmento (SOARES, 2006).

O que torna esta técnica singular em se tratando da confirmação da identidade de compostos presentes em amostras, é o fato de que sempre que as mesmas condições de fragmentação são empregadas, o perfil de abundância relativa obtido permanece sempre igual para um mesmo composto Outro fato importante é que dois compostos diferentes apresentam padrões de fragmentação diferentes mesmo quando as condições de fragmentação usadas são as mesmas (SOARES 2006). Assim sendo, se o peso molecular do composto de interesse é conhecido, para confirmar a identidade de uma

amostra basta observar se durante a análise íons que possam caracterizar o composto são formados.

2.4 Pré- Validação: Condições Cromatográficas Ideais e Melhor Método de Extração

2.4.1 Fase Estacionária

A fase estacionária (FE), na forma de coluna cromatográfica, pode ser considerada o componente principal do sistema de CLAE, pois é nela que ocorre a separação dos componentes da amostra, e é justamente pela escolha dela que se inicia o planejamento de um estudo cromatográfico (LANÇAS, 2009).

As FEs de sílica modificada são chamadas de fases ligadas. Neste tipo de material, os grupos silanóis expostos têm o hidrogênio ou o grupo hidroxila inteiro substituído por uma cadeia carbônica. As colunas de fase ligada são responsáveis pelo grande avanço conseguido em separações de compostos e têm predominado em CLAE, levando a cromatografia e sílica a se tornarem praticamente sinônimos (LANÇAS, 2009).

As fases ligadas, cuja cadeia orgânica é unicamente um hidrocarboneto saturado com dois a trinta carbonos ou um grupamento fenil, são classificadas como fase reversa por serem apolares (também chamadas de lipofílicas). Quanto mais longa é a cadeia carbônica do substituinte, maior sua capacidade de reter compostos apolares ou com partes da molécula essencialmente lipofílicas e as fases móveis para esse tipo de FE geralmente são constituídas de água e solvente miscíveis como acetonitrila e metanol (SOARES, 2006).

O uso das FE que possuem uma base de sílica restringe o seu uso a potenciais hidrogeniônicos (pH) a valores entre 2,0 e 8,0, pois, acima de pH 8,0 a sílica sofre dissolução gradual, destruindo assim a estrutura do empacotamento. Para usos em pHs mais elevados, é necessário usar como FE uma resina de poliestireno-divinilbenzeno com alto grau de ligações cruzadas para garantir sua rigidez e possibilitar seu uso em CLAE (SOARES, 2006).

A grande maioria dos trabalhos envolvendo o desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação de tiazacridinas, tiazolidinadionas e tiazolidinas utilizam como fase estacionária (FE) colunas de octadecilsilano (C_{18}) (UCHOA et al., 2010; SUN et al., 2009; UCHOA et al., 2008, HE et al., 2007; SRIPALAKIT et al., 2006; SUN et al., 2006, KOLTE et al., 2003; RADHAKRISHNA et al., 2002; TAKENAGA et al., 1995) ou fenil (HRUSKA & FRYE, 2004). Mas é importante mencionar o estudo feito por Coufal e colaboradores (2002) para a quantificação e determinação da pureza de 10 tioacridinas sintetizadas na Faculdade de Farmácia de Marselha. Neste trabalho foi verificado que tioacridinas que continham em sua estrutura grupamentos amino (NH_2) não foram eluídas (mesmo alterando-se a composição da FM e utilizando-se tampão acetato 0,2 M) em corridas cromatográficas que duraram 60 minutos. O autor afirma que a alta atividade dos grupamentos silanóis da FE induz sua afinidade por compostos básicos, que podem ser retidos fortemente, ou mesmo de maneira irreversível pela coluna do tipo C_{18} . Então, se o objeto do estudo for uma acridina com um grupamento amino, se faz necessário o uso de outra coluna que não a C_{18} . E esse fato pode ser observado no trabalho desenvolvido por Jayewardene e colaboradores (1997) na determinação de um novo agente anticancer (a nitro-9-metoxiacridina) em plasma humano. No trabalho o autor usou uma coluna de cianopropil, muito provavelmente por encontrar problemas na eluição na nitroacridina quando se utilizou a coluna de escolha C_{18} , corroborando o que foi observado por Coufal.

2.4.2 Fase Móvel

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de um método cromatográfico para a análise de uma nova substância é a determinação das condições cromatográficas ideais. Dentre essas condições, a escolha de uma fase móvel (FM) adequada é um dos pontos cruciais no desenvolvimento da técnica. A FM tem que ser compatível com a coluna e ter certa afinidade pela molécula em estudo, de modo que ela possa “arrastar” a mesma para fora da coluna de uma maneira seletiva e com um tempo de retenção relativamente curto, para viabilizar o maior número de análise em um curto espaço de tempo. Ela ainda deve preencher alguns requisitos básicos para a sua utilização como: ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação, ser capaz de solubilizar a amostra, apresentar baixa viscosidade, ser compatível com o detector utilizado e ter polaridade

adequada ou ajustada de acordo com a FE utilizada no ensaio (MEYER, 2004; AQUINO-NETO, 2003).

Por se tratar de uma nova molécula, foram utilizadas, em um primeiro momento, fases móveis baseadas em métodos já desenvolvidos e validados para análise por LC-UV, LC-MS ou LC-Fluorescência de compostos com estrutura química semelhante ao LPSF/AC-23 (tiazacridinas, tiazolidinas e tiazolidinadionas).

Seguindo este raciocínio, tem-se o trabalho realizado por Uchoa e colaboradores (2008) que desenvolveram e validaram um método para a quantificação de uma tiazolidinona com ação antiinflamatória em plasma de ratos. Neste estudo os autores utilizaram uma FM constituída de metanol e água (90:10 v/v) conseguindo um bom tempo de retenção (o tempo total da corrida foi de 7,5 minutos) e picos com uma boa resolução. O mesmo autor em 2010, continuando os estudos com essa molécula, desenvolveu e validou um método por LC-MS lançando mão de uma FM constituída de acetonitrila (ACN) e solução aquosa contendo 10 mM de hidróxido de amônio (90:10 v/v), conseguindo também bons resultados.

Ning Sun e colaboradores (2006 e 2009) desenvolveram e validaram um método utilizando a Cromatografia Líquida com Detecção por Fluorescência e Cromatografia Líquida Ultra Rápida (UFLC) para a determinação de uma nova tiazolidinadiona (MCC-555) com estrutura química parecida com o LPSF/AC-23 em plasma de cachorro e rato. Nestes dois estudos os autores utilizaram uma FM constituída de tampão fosfato (10mM, ph 4,5) e ACN (35:65, v/v) e eles conseguiram obter picos cromatográficos com uma boa resolução em ambos trabalhos com tempos de retenção para os analitos de 10,6 e 12 minutos respectivamente.

Outro estudo, ainda levando-se em conta a definição da melhor FM, foi o realizado por He e colaboradores (2007), onde foi desenvolvido e validado um método seletivo e sensível utilizando LC-MS para a quantificação da rosiglitazona em plasma humano. Neste trabalho a FM utilizada pelos autores foi constituída de tampão acetato (20mM, ph 6,5) e ACN (47:53, v/v), com isso obtendo picos com uma boa resolução e um tempo de análise total de 8 minutos utilizando uma coluna de 150 mm.

Ainda pesquisando-se estudos com tiazolidinadionas, na determinação quantitativa da pioglitazona (um análogo estrutural da rosiglitazona) por LC-UV,

Sripalakit (2006) utilizou como FM uma mistura constituída de metanol/ACN/tampão Fosfato (10mM, pH 2,6) (40:12:48, v/v/v), e os autores também obtiveram picos cromatográficos bem resolvidos e separados com um tempo total de análise de 10 minutos utilizando uma coluna de 250 mm.

Kolte e colaboradores (2003) desenvolveram e validaram um método para determinação da rosiglitazona em plasma humano utilizando como FM metanol e tampão fosfato 10 mM (pH 2.6) (30:70 v/v). O autor conseguiu uma boa separação e resolução dos picos cromatográficos e o tempo total de análise foi de 18 minutos. Já Hruska & Frye (2004) também estudando um método para se determinar a rosiglitazona em plasma humano, utilizaram como FM tampão acetato 10 mM (pH 5,0) e ACN (60:40 v/v) obtendo picos também bem resolvidos e com uma boa resolução. O tempo total da análise foi de 15 minutos.

O estudo desenvolvido por Takenaga e colaboradores (1995) em um novo agente anticâncer com estrutura policíclica semelhante ao LPSF/AC-23, foi utilizada uma FM constituída de ACN/metanol/água (19:15:66 v/v/v).

Lintelmann et al. (2010), estudando um método para a determinação dos azarenos (estruturas policíclicas com um átomo de nitrogênio no meio) nas partículas da atmosfera realizou uma corrida cromatográfica com uma eluição por gradiente na qual a quantidade de metanol presente na FM variou de 5% até 100%. O outro componente da FM era uma solução de ácido fórmico 0,1% em água (pH 2,3).

Radhakrishna et al. (2002) determinou quantitativamente a rosiglitazona em formulações farmacêuticas utilizando um método por cromatografia líquida (LC) em que a FM foi constituída de tampão fosfato 25 mM (pH 6,2) e ACN (50:50 v/v). Os picos tiveram uma boa resolução e o tempo total da corrida levou 14 minutos.

Quando se analisa os estudos envolvendo o desenvolvimento e validação de métodos utilizando LC para a quantificação de derivados acridínicos ou tiazacridínicos, o que se encontra são poucos artigos, já que essa classe de moléculas passou recentemente a ser vista com mais interesse no que diz respeito as suas propriedades anti-neoplásicas (SCHOFIELD et al., 1999). Porém, um trabalho que merece destaque foi o realizado por Coufal e colaboradores em 2002. Neste ensaio ele quantificou e determinou a pureza de dez novas acridinas sintetizadas na Faculdade de Farmácia de

Marselha utilizando LC. Ele também investigou a influência da acetonitrila (ACN) (em concentração que variavam de 60 – 100%) na composição de FMs constituídas de ACN e água. O que se observou foi que acridinas sem grupamentos amino (NH_2), foram eluidas usando todas as FMs, contudo, longos tempos de análise (mais de 50 minutos) foram observados com eluentes com um baixo conteúdo de ACN. Também foi verificado que, quando se substituía a água por um tampão acetato (pH 3,5), pouca mudança do perfil de retenção das acridinas era observado, mas notava-se uma melhora na simetria dos picos e na eficiência de separação dos mesmos para acridinas sem grupamento amino.

Jayewardene et al. (1997) na determinação de um novo agente anti-câncer (uma pirazoloacridina) em plasma humano utilizou como FM uma mistura de tampão acetato 125 mM (pH 4,75) e ACN (76:24 v/v) conseguindo picos bem definidos e um tempo total de corrida de 13,7 minutos.

Frente ao que foi explanado sobre FE e FM é importante ter em mente que é a seleção criteriosa destes dois importantes componentes do sistema cromatográfico que irá determinar a eficiência da separação dos componentes que fazem parte da amostra e, esta escolha será crucial para obtenção de resultados satisfatórios e o planejamento dos ajustes necessários (BEDOR, 2007).

2.4.3 Fluxo

O fluxo é uma variável que também deve ser bem ajustada durante estudos de validação. Se ele for muito baixo, poderá fazer com que os analitos de interesse demorem muito para serem eluídos, podendo levar a uma inviabilidade do método, principalmente para análises em batelada ou, no termo em inglês “*high-throughput*” (em que existe uma grande quantidade de amostras). Por outro lado, se o fluxo for muito elevado, isso poderá fazer com que os analitos sejam eluídos juntamente com os componentes plasmáticos ou fazer com que dois compostos que saiam da coluna em tempos distintos, sejam eluídos juntos.

Em todos os trabalhos pesquisados envolvendo as tiazacridinas, tiazolidinas e tiazolidinadionas que usavam a técnica que será usada neste estudo (cromatografia líquida com detector por absorção de radiação (seja por UV ou por fluorescência))

utilizaram fluxos nos valores de 0,9 mL/min (JAYEWARDENE et al., 1997) de 1mL/min (SUN et al., 2009; UCHOA et al., 2008; SUN et al., 2006; HRUSKA & FRYE, 2004; RADHAKRISHNA et al., 2002; TAKENAGA et al., 1995), 1,2 mL/min (SRIPALAKIT et al., 2006; KOLTE et al., 2003).

2.4.4 Temperatura

A temperatura do ensaio deve ser ajustada de maneira que permita uma boa separação dos compostos de interesse e não cause a degradação dos analitos presentes na amostra. Os trabalhos pesquisados que especificaram a temperatura na qual foram feitos os experimentos, mostram que a maioria dos autores utilizou valores que variaram de temperatura ambiente até 40°C, a saber: temperatura ambiente (O'MAILLE et al., 2008; HE et al., 2007; SRIPALAKIT et al. 2006; RADHAKRISHNA et al., 2002), a 30 °C (KOLTE et al., 2003;), a 35°C (SUN at al., 2006 e 2009) a 40°C (TAKENAGA et al., 1995).

2.4.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH da FM é uma variável de extrema importância no delineamento de um estudo de validação em matrizes complexas. Ele pode influenciar sobremaneira o tempo em que uma substância fica retida na FE, aumentando-o ou diminuindo-o. Isso acontece porque compostos com caráter básico são completamente ionizados em FMs com baixos valores de pH, e sua ionização é acompanhada por uma diminuição no tempo de retenção (TR) da análise cromatográfica. Um aumento contínuo do pH leva a supressão da ionização dessa base fraca e, conseqüentemente, a uma retenção mais forte do analito a FE devido ao aumento da hidrofobia do mesmo. De maneira contrária, um ácido fraco quando em valores de pH altos, está totalmente ionizado, tendo assim uma menor afinidade pela FE apolar (SÝCORA et al., 2002). Isso não significa que todos os analitos são sensíveis a mudança de pH. Existem substâncias que serão fortemente influenciadas, e existem substâncias que praticamente não terão seus TR alterados mesmo variando os valores de pH da FM. Portanto, é necessário que o analista verifique experimentalmente essa influência e daí a importância de se conhecer o valor de pKa

da molécula que se está estudando, pois uma maneira de se verificar essa influência é alterando os valores de pH da FM em faixas perto do pKa do analito. Se a molécula for fortemente influenciada, alterações significativas irão ocorrer no seu TR. Por outro lado, se a molécula for pouco influenciada por alterações de pH, serão observadas somente pequenas alterações no TR da mesma (SÝCORA et al., 2002).

Nesta revisão da literatura, alguns estudos não revelam as condições de pH da FM em que as análises foram realizadas, mas os trabalhos que expõem esses dados mostram que todos os testes foram feitos em meios ácidos, com o valor de pH variando entre 2,3 e 6,5 (LINTELMANN et al. 2010; SUN et al. 2006 e 2009; HE et al., 2007; SRIPALAKIT et al., 2006; HRUSKA & FRYE, 2004; KOLTE et al., 2003; COUFAL et al., 2002; RADHAKRISHNA et al., 2002; JAYEWARDENE et al., 1997). Esse fato é devido à característica de base fraca das acridinas, tiazacridinas, tiazolidinas e tiazolidinadionas. Como os trabalhos pesquisados utilizaram uma coluna C₁₈ ou fenil em pH ácido, provavelmente os analitos estariam em seu estado ionizado e não molecular, tendo, portanto, uma menor afinidade pela FE apolar e eluindo em tempos menores (SÝCORA et al., 2002).

2.4.6 Método de Extração

Depois de definidas as condições cromatográficas ideais, o próximo desafio na etapa de validação de um método cromatográfico é a etapa de preparação das amostras.

A etapa de preparação das amostras é um dos pontos críticos no processo de validação de métodos bioanalíticos. Trata-se de uma operação complexa que, se não feita de maneira adequada, é responsável por uma grande variabilidade dos dados de um processo de análise, induzindo, portanto, a erros, pois pode ocorrer a contaminação da amostra ou mesmo perda do analito (HERNANDES-BORGES et al., 2007; ERNY & CIFUENTES, 2006; GILAR et al., 2001). Como as amostras podem ter origens diversas (solo, sangue, comprimidos, urina, plasma, etc) elas precisam passar por um processo de purificação ou “cleaning up” antes de serem introduzidas no cromatógrafo (para não danificar a coluna) e, dependendo da complexidade da amostra, esse processo pode ser constituído de várias etapas, consumindo assim uma boa parcela do tempo total (até 80%) que será gasto na análise da amostra e também onerando o processo

(JARDIM, 2010; LANCAS, 2009). Por isso, a escolha de uma técnica de extração adequada é um fator primordial para obtenção de resultados confiáveis e exatos.

A escolha do método de extração depende de vários fatores como: natureza da amostra, tipo de matriz, das características do analito e técnica analítica que será empregada na determinação, devendo ser feita uma análise caso a caso (HERNANDES-BORGES et al., 2007). Sempre lembrando que, idealmente, o método deve ser o mais simples possível (pois quanto maior o número de etapas, maior a possibilidade de se introduzir erros), rápido e de baixo custo (para possibilitar uma análise em batelada ou “high-throughput”), seletivo (ser adequado ao analito em detrimento a possíveis interferentes) e sensível (adequado ao limite de detecção do aparelho, podendo inclusive ser incluída uma etapa de concentração do analito para se obter uma concentração detectável pelo instrumento e diminuindo também a quantidade de reagentes e solventes utilizados).

Matrizes biológicas são amostras consideradas de alta complexidade, pois possuem em sua composição uma grande quantidade de compostos endógenos que podem interferir ou interagir com o analito de interesse também presente na amostra (BEDOR 2007). Por isso os objetivos da etapa de preparação ou pré-tratamento das amostras para análise de componentes nos fluidos biológicos são: (i) remoção dos contaminantes macromoleculares (principalmente as proteínas), (ii) remoção de outros componentes interferentes da amostra, (iii) concentrar o analito de interesse (se possível) e (iv) combinar o solvente da amostra com o usado na composição da fase móvel (GILAR et al., 2001; QUEIROZ & LANCAS, 2005).

Em estudos pré-clínicos e clínicos a matriz biológica mais utilizada é o plasma e por isso precisa-se, na etapa de pré-validação, desenvolver um método de extração que cumpra os requisitos descritos no parágrafo anterior. Existem três métodos principais de extração usados em preparação de amostras complexas: **Extração por Precipitação Protéica**, **Extração em Fase Sólida (EFS)** e **Extração Líquido-Líquido (ELL)**. Por se tratar do desenvolvimento de um novo método, o ideal seria testar os três processos para que se saiba qual deles tem um maior rendimento de extração e uma menor interferência como pico cromatográfico do analito. Mas por causa do custo relativamente alto da EFS, neste estudo só será realizada a extração por precipitação

protéica e ELL. Uma breve explanação de cada um desses métodos será feita nos próximos parágrafos.

A Extração por Precipitação Protéica ainda é o método mais simples e rápido para remover a maioria das proteínas plasmáticas, tendo a vantagem de ser um procedimento que funciona para a maioria dos compostos (XU, et al 2005, ERNY et al 2006). Diferentes agentes podem ser usados para causar a precipitação protéica (solventes orgânicos, ácidos, sais e íons metálicos) tendo cada um deles o seu mecanismo de ação específico para causar a precipitação.

Solventes orgânicos diminuem a constante dielétrica da proteína plasmática em solução, o que aumenta a atração entre moléculas carregadas e facilita a interação eletrostática entre as proteínas. O solvente orgânico também desloca as moléculas de água que estavam ordenadas ao redor dos sítios hidrofóbicos na superfície da proteína. As interações hidrofóbicas entre as proteínas são então minimizadas como resultado do solvente orgânico agora em volta da proteína, enquanto as interações eletrostáticas se tornam predominantes, levando a agregação protéica (POLSON et al., 2003).

Os agentes precipitantes ácidos formam sais insolúveis ao reagirem com o grupamento amino de carga positiva dos aminoácidos das proteínas, levando à precipitação das mesmas. Já os sais causam a precipitação protéica, porque os seus íons atraem as moléculas de água da solução, levando-as para longe das regiões hidrofóbicas da superfície das proteínas, o que resulta numa agregação das moléculas de proteínas via interação hidrofóbica proteína-proteína. Os íons metálicos causam a precipitação protéica, porque elas ficam competindo com os prótons em solução pelos sítios de ligação dos aminoácidos. A ligação mais forte dos íons metálicos desloca os prótons dos sítios de ligação, resultando numa diminuição do pH da solução. Essa combinação entre a mudança do ponto isoelétrico da proteína de diminuição do pH geralmente culmina com a precipitação das proteínas (POLSON et al., 2003).

A quantidade de agente precipitante que pode ser utilizado varia bastante, podendo usar proporções que variam desde 1:1 até 1:6 de plasma/agente precipitante protéico (POLSON, et al. 2003; XU, et al. 2005). Destes agentes precipitantes os que são mais utilizados para matrizes plasmáticas são a ACN e o metanol.

Nesta revisão, os seguintes autores utilizaram a precipitação protéica para o “*clean up*” do plasma: Uchoa et al.(2010), Uchoa et al., (2008), He et al. (2007), Sun et al. (2006), Xu et al. (2005), Hruska & Frye (2004) e Jáyewardene et al. (1997).

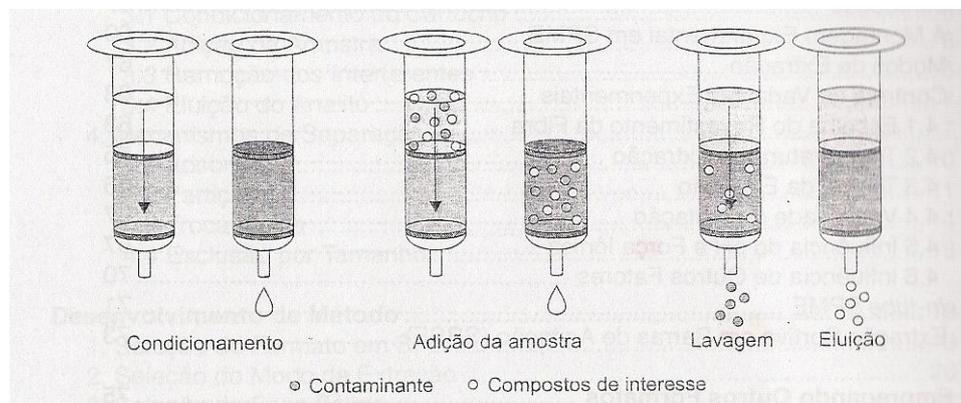
A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica. Do ponto de vista prático a EFS, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida na qual se emprega uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, que contém a fase sólida ou FE (LANÇAS, 2004a). Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg do sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. Atualmente um número grande de sorventes estão disponíveis comercialmente e, em geral, os materiais de recheio são similares aos usados em LC: carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio, polímeros, etc (QUEIROZ et al., 2001).

Recentemente, extrações altamente seletivas são baseadas em colunas recheadas com suporte contendo um anticorpo específico (imunoafinidade). Um exemplo disto é a determinação de insulina em amostras de plasma onde a extração seletiva é realizada em um cartucho recheado com o seu anticorpo anti-insulina. Outro material, denominado fase de acesso restrito, tem seu mecanismo de separação baseado em uma combinação de exclusão e partição. As moléculas grandes, tais como proteínas, não conseguem penetrar nos poros e eluem rapidamente, enquanto as moléculas pequenas entram nos poros e são retidas, para posterior eluição e análise. Este tipo de material tem sido usado para a análise direta, sem remoção prévia de proteínas, de amostras de plasma e soro (QUEIROZ et al., 2001).

De maneira simplificada, o processo acontece da seguinte maneira: (i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; (ii) prepara-se o cartucho para receber a amostra através do condicionamento do mesmo com um solvente adequado; (iii) a solução contendo o analito é pressionada levemente com uma seringa ou gás (processo automatizado) de forma a penetrar no cartucho; (iv) lava-se o cartucho com um solvente que irá reter o analito e eluir as impurezas ou vice-versa, fazendo com que a substância de interesse seja isolada dos demais componentes da amostra; (v) o analito retido no cartucho é eluído utilizando-se outro solvente, fazendo com que o mesmo já seja

coletado em uma concentração já apropriada para a análise. A figura 2.5 ilustra bem as etapas do processo:

FIGURA 2.5 Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos).



Fonte: LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE). São Carlos, 2004.

A EFS tem tido cada vez mais aceitação entre os analistas devido a algumas vantagens em relação à técnica da extração por precipitação protéica e ELL, sendo as principais: relativa rapidez, facilidade de automação (permitindo extrair dezenas de amostras simultaneamente), alta recuperação do analito, boa reprodutibilidade, não há a formação de emulsões e alta capacidade de concentração do analito (HERNANDES-BORGES et al., 2007; LANÇAS, 2004a; GILAR et al., 2001). Além disso, a EFS também é muito utilizada quando se trata de uma análise mais complicada como, por exemplo, a separação de compostos quirais, onde a técnica da precipitação protéica não é adequada, pois as proteínas solúveis não extraídas podem atrapalhar a análise (ERNY et al 2006). A principal desvantagem desse método, e às vezes é o fator limitante na escolha, é o seu custo relativamente alto. Nos artigos pesquisados os autores que utilizaram esse método de extração foram Sripalakit et al. (2006) e Takenaga et al. (1995).

A ELL também é um método largamente empregado na preparação de amostras. Nesta técnica ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) e a sua eficiência de extração vai depender da afinidade do analito pelo solvente de extração (QUEIROZ et al., 2001). Por se poder escolher o solvente de extração que melhor se encaixa com o analito (através da análise de parâmetros como o coeficiente de partição e polaridade) ele oferece uma melhor seletividade em comparação ao

método de precipitação protéica (GILAR et al., 2001) e dependendo desta escolha, é uma técnica que consegue extrações mais limpas (ERNY et al. 2006). Outra vantagem da ELL é que as proteínas presentes na amostra são desnaturadas, eliminando assim a contaminação da coluna cromatográfica (QUEIROZ et al., 2001). Por outro lado, a ELL é de difícil automação e geralmente é mais demorada e mais trabalhosa. Isso se deve ao fato desta técnica envolver algumas etapas a mais como, por exemplo, a evaporação das amostras sob nitrogênio e posterior ressuspensão das mesmas (para concentração do analito) em um solvente adequado. Este fato pode inviabilizar o projeto quando, por exemplo, se deseja uma análise em batelada (“*High-throughput*”) além dela não poder ser usada na análise de compostos voláteis ou semi-voláteis. Outra desvantagem da ELL é que as amostras com alta afinidade pela água podem ser parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito e, se não for utilizado solventes com alto grau de pureza, as impurezas neles contidas serão concentradas juntamente com a amostra. Na ELL também pode ocorrer a formação de emulsões quando se mistura a fase aquosa com o solvente orgânico, resultando em um grande consumo de tempo para resolver o problema. Além disso, em tempos que se buscam cada vez mais métodos que não agridam o meio ambiente, a ELL consome volumes relativamente grandes de solvente (e alguns deles são tóxicos), gerando assim problemas de descarte para o analista (QUEIROZ et al., 2001).

Vários tipos de solvente orgânicos têm sido empregados na extração de drogas ácidas ou básicas presentes em amostras de fluidos biológicos, sendo os principais: éter dietílico, acetato de etila, hexano, tolueno, diclorometano, acetato de butila e misturas desses solventes (QUEIROZ et al., 2001).

Os trabalhos pesquisados que utilizaram a ELL foram: Sun et al (2009), O’Maille et al., (2008) e Kolte et al., (2003).

2.5 Validação do Método: Definição da Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Recuperação

Para garantir a veracidade dos resultados gerados, os ensaios cromatográficos devem ser validados. A etapa de validação de um método analítico visa garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto ele deve apresentar os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, recuperação, precisão e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003). Em outras palavras, validação é a evidência documentada de que um processo ou sistema realiza a função que lhe foi proposta (ANSEL, 2007).

A validação visa diminuir ou controlar os fatores que causam inexatidões dos dados gerados, minimizando a influência de variáveis que são permissivas às discrepâncias no método. Entre essas variáveis, as mais comuns são: (i) variabilidade de amostra; (ii) eventual contaminação da amostra; (iii) reagentes inadequados; (iv) pipetagem incorreta; (v) variações de temperatura; (vi) variações e descuidos na manutenção do equipamento; (vii) calibração ineficiente do equipamento; (viii) despreparo do analista e (ix) perdas durante a análise (LANÇAS, 2004b).

Cada país tem um órgão regulador que dita as exigências a que o método deve passar para ser considerado validado. Nos Estados Unidos o órgão é o Food and Drug Administration (FDA), os países europeus seguem o European Medicines Agency (EMA) e no Brasil o órgão que estabelece essas exigências é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da sua **Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003**. Os parágrafos a seguir tratam de uma maneira mais detalhada os parâmetros contidos nesta legislação, e que servirão de norteamento no decorrer deste estudo.

2.5.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Ela deve ser avaliada para

demonstrar que os analitos de interesse no estudo conseguem ser determinados e que sua quantificação não é afetada pela matriz biológica (efeito matriz), metabólitos conhecidos e produtos de degradação (SILVA, 2011).

O termo *seletividade* tem sido empregado como sinônimo de especificidade, a despeito da objeção de alguns autores. De fato, o termo *específico* refere-se a um método que produz uma resposta a um único analito, enquanto o termo *seletivo* refere-se a um método que fornece resposta a um grupo de entidades químicas que podem ou não ser distinguíveis umas das outras. Se a resposta do composto de interesse é distinguível das outras respostas, o método é determinado seletivo. Na prática, poucos métodos respondem a apenas um analito, fazendo com que o termo seletividade seja mais adequado (LANÇAS, 2004b).

Em geral, uma forma simples de se verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do(s) analito(s) de interesse injetando-se um branco (matriz biológica sem a presença do analito) obtido com a mesma matriz (sangue, plasma, soro, urina, etc) a ser analisada. Deve-se empregar várias amostras, e a ausência de picos próximos ao TR do(s) analito(s) de interesse deve ser observado. Entretanto, para matrizes complexas (como resíduos de pesticidas em alimentos, fármacos no plasma, etc), somente este critério não poderá ser suficiente para atestar a seletividade do método. Deve-se ainda, demonstrar que o pico observado no TR do(s) analito(s) de interesse possui apenas o componente, ou seja, é realmente a substância procurada. Isso é importante em decorrência da possibilidade de co-eluição do composto com outros interferentes, principalmente em análises contendo muitos compostos (LANÇAS, 2004b).

Há duas maneiras mais comuns de verificar co-eluição em cromatografia. A primeira consiste em analisar a amostra em duas colunas contendo características diferentes, como, por exemplo, uma coluna apolar e outra polar. Atualmente, há outras formas mais seguras de verificar a pureza do pico cromatográfico. A mais segura é o uso de um espectrômetro de massas como detector em cromatografia. Obtendo-se o espectro de massas do pico é possível detectar, na maioria dos casos, a pureza do pico (LANÇAS, 2004b).

2.5.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. No caso de gráficos de calibração, muitas vezes denominados “curvas de calibração” deve-se construir um gráfico relacionando a resposta do equipamento em função de varias concentrações do analito em estudo. A variável independente (eixo horizontal ou X) relaciona-se às várias concentrações preparadas da substância de interesse, e a dependente (eixo vertical ou Y), ao sinal analítico obtido (área do pico) para cada concentração do analito. Uma variação desse procedimento consiste em adicionar um padrão interno a cada solução do analito, de forma a corrigir desvios durante o procedimento analítico (LANÇAS, 2004b).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, **cinco** concentrações diferentes. Se houver relação linear após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (BRASIL, 2003).

Neste estudo, será adotada a metodologia da determinação por **Padrão Interno**. Uma breve revisão sobre este método será feita a seguir:

2.5.2.1 Método do Padrão Interno

Padrão Interno (PI) é uma substância que é adicionada à amostra (no caso o plasma) que contém o analito. O PI não deve interferir na análise e para isso ele deve: (i) nunca ser encontrado naturalmente na amostra; (ii) estar disponível em elevado grau de pureza; (iii) ser adicionado a amostra em concentrações similares ao composto a ser analisado e (iv) ser bem resolvido dos demais picos cromatográficos que apareçam na análise (LANÇAS, 2004b).

Outro pressuposto para o uso de um PI, é que as características do analito e do PI sejam muito similares, pois isso ajudará a determinar se o método é seletivo, ou seja: se consegue separar duas substâncias muito parecidas quimicamente (KARNES, 1991).

Também é desejável, quando se trabalha com um detector de radiação UV que o PI absorva bem na região do espectro de absorção máxima do analito. Isso permitirá que tanto o analito como o PI possam ser monitorados no mesmo comprimento de onda (JAYEWARDENE et al., 1997).

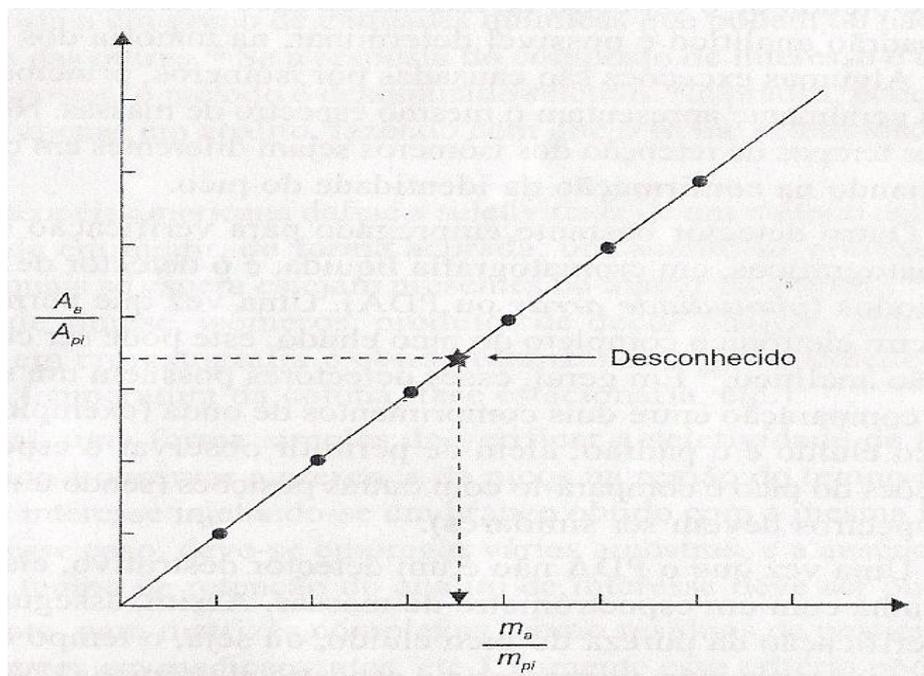
Os PIs servem também como marcadores quantitativos, para monitorar a estabilidade do detector e corrigir erros no processo de diluição e pipetagem, já que são adicionados à amostra que contém o analito sempre nas mesmas concentrações (se forem observadas respostas diferentes, quer dizer que pode ter havido algum erro de diluição na etapa de preparação das amostras) (KARNES, 1991).

Pode-se utilizar como PI fármacos já consagrados no mercado (SUN et al., 2009; HE et al., 2007; SUN et al., 2007; SRIPALAKIT et al., 2006; KOLTE et al., 2003) metabólitos ou moléculas originadas de substituições de grupamentos do analito (O'MAILLE et al., 2008; TAKENAGA et al., 1995) ou até mesmo produtos intermediários das etapas de síntese do próprio analito (SUN et al., 2006).

Os passos a serem seguidos nesta metodologia são os seguintes: deve-se preparar várias soluções do PI e do componente de interesse e, a partir delas, construir uma curva de calibração similar àquela para o padrão externo (onde o gráfico é gerado com as áreas dos picos obtidos em função das massas/concentrações dos padrões que a geraram), com a diferença que agora a área da amostra (A_a) é dividida pela área do PI (A_{pi}) e lançada no gráfico contra a massa/concentração da amostra (m_a) dividida pela massa/concentração do PI (m_{pi}). A seguir, mistura-se uma quantidade conhecida da amostra com uma quantidade conhecida do PI. Cromatografando-se a mistura, obtém-se A_a e A_{pi} e calcula-se a razão A_a/A_{pi} . Obtendo-se esse valor, a interpolação do gráfico de calibração permite encontrar a razão de massa/concentração m_a/m_{pi} . Multiplicando-se esse valor (m_a/m_{pi}) pela massa/concentração do PI conhecida, obtém-se o valor da massa/concentração do componente em questão, como se pode observar na equação 1 e figura 2.6 abaixo:

$$m_a = (m_a/m_{pi}) \times m_{pi} \quad (1)$$

FIGURA 2.6: Determinação da massa/concentração de um componente desconhecido pelo método do padrão interno.



Fonte: LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. Editora Rima. São Carlos, 2004.

A quantificação de uma substância utilizando o método do padrão interno, apesar de se mais trabalhoso (pois envolve etapas extras como determinação da recuperação, precisão e exatidão também para o PI), torna o estudo muito mais confiável e, atualmente, este tem sido o método mais aceito e utilizado pela comunidade científica quando se fala em estudos de quantificação.

2.5.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

Ela deve ser verificada utilizando-se, no mínimo, 3 concentrações (baixa, média e alta) contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 determinações por concentração (análise em quintuplicata). A precisão deve ser determinada para corridas realizadas em um mesmo dia (intra-dia) e para corridas realizadas em dias diferentes (inter-dias). É expressa como Desvio Padrão Relativo

(DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) (equação 2), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003).

$$\text{DPR} = \text{DP}/\text{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor considerado verdadeiro (BRASIL, 2003).

Ela deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 concentrações (baixa, média e alta) contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 determinações por concentração (análise em quintuplicata). A exatidão deve ser determinada para corridas realizadas em um mesmo dia (intra-dia) e para corridas realizadas em dias diferentes (inter-dias). É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (equação 3). O desvio não deve exceder valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão} = \text{Concentração média experimental} / \text{Concentração teoria} \times 100 \quad (3)$$

2.5.5 Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

O Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O LD é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais (CLAE, cromatografia gasosa, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 2 a 3 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

O Limite Inferior de Quantificação (LIQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O LIQ pode ser estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis ou utilizar a razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base (BRASIL, 2003)

Atualmente, a maioria dos softwares desenvolvidos para a análise cromatográfica calcula automaticamente o LD e o LIQ através da relação sinal ruído que o analista informa ao programa, facilitando em muito a análise.

2.5.6 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do PI próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o PI separadamente (BRASIL, 2003).

Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações maiores ou iguais a 70% são aceitas, a menos que a faixa desejada seja especificada com outros valores (LANÇAS, 2004b).

2.6 Estudos de Estabilidade do Analito em Matrizes Biológicas

A estabilidade de um analito refere-se ao tempo durante o qual as soluções-padrão e da amostra contendo o analito podem ser utilizadas sem que haja decomposição apreciável dentro das condições experimentais fixadas (LANÇAS, 2004b).

Essas determinações são importantes, uma vez que o analito pode sofrer transformações químicas durante o procedimento analítico. As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20% (BRASIL, 2003).

A estabilidade do analito em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (LANÇAS, 2009; BRASIL, 2003). As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras, devendo ser realizado os seguintes ensaios: (i) estabilidade de curta duração; (ii) estabilidade de longa duração; (iii) estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e (iv) estabilidade das soluções-padrão.

2.6.1 Estabilidade de Curta Duração

Para verificação desta estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de quatro a vinte quatro horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003).

2.6.2 Estabilidade de Longa Duração

O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última. Geralmente os estudos de estabilidade de longa duração duram de dois a trinta dias. Para verificação desta estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico.

A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para armazenamento das amostras, normalmente igual a -20°C . Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras preparadas no primeiro dia do teste (BRASIL, 2003).

2.6.3 Estabilidade Durante Ciclos de Congelamento e Descongelamento

Deve-se testar a estabilidade do analito após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por vinte e quatro horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por doze a vinte quatro horas e assim sucessivamente até completar os três ciclos, quantificando-se o analito nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003).

2.6.4 Estabilidade das Soluções-padrão

Deve ser analisada a estabilidade das soluções-padrão do analito e do PI (se houver), mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, seis horas após a preparação. Em caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do analito e do PI (BRASIL, 2003).

III. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver e validar um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação quantitativa do derivado LPSF/AC-23 com atividade antitumoral em plasma de ratos Wistar.

3.2 Específicos

- Determinar as condições cromatográficas ideais para o ensaio analítico (tipo de coluna, fluxo, influência da matriz biológica, método de extração do LPSF/AC-23) - Etapa de Pré-validação do método.
- Determinar seletividade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação do método proposto - Etapa de Validação do método.
- Determinar estabilidade do LPSF/AC-23 no plasma, bem como no solvente utilizado na preparação da solução de trabalho a ser empregada.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de Realização do Estudo

O desenvolvimento e validação do método bioanalítico será realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

4.2 O Derivado Tioacridínico, Padrão Interno e Reagentes Químicos

O LPSF/AC-23 e o PI foram fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos/GPIT/UFPE). Todos os demais reagentes químicos utilizados no estudo foram grau HPLC ou P.A sendo eles:

- Acetonitrila: Fabricante Carlo Erba (Milão – Itália)
- Ácido Tricloroacético: Fabricante Synth (Diadema-Brasil)
- Água Ultrapura obtida por aparelho MilliQ no Laboratório de Biofísica Celular do Departamento de Biofísica.
- Fosfato de Sódio Bibásico: Fabricante Vetec (Rio de Janeiro – Brasil)
- Hidróxido de Sódio P.A.:Fabricante Vetec (Rio de Janeiro – Brasil)
- Metanol: Fabricante Carlo Erba (Milão – Itália)
- Solução de Ácido Fórmico 85%:Fabricante Vetec (Rio de Janeiro – Brasil)

4.3 Obtenção da Matriz Biológica

Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico foram utilizadas amostras de plasma de ratos Wistar de idade entre 60 e 90 dias e com o peso variando entre 200 – 300 g, obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), sendo toda metodologia aprovada por este órgão, o que pode ser confirmado através do processo nº 23076.024804/2009-62 (Anexo 1).

A coleta do sangue para a obtenção de plasma foi realizada através de punção intracardíaca utilizando seringa de vidro de 20 ml e agulha 12x40mm ambas da marca “*Becton, Dickinson Ind. Cirurgicas LTDA*” com os animais previamente anestesiados.

A anestesia dos animais foi administrada por via intraperitoneal com os anestésicos cetamina (na forma de cloridrato) 100mg/ml fabricado por “*Sespo Industria e Comércio LTDA*” e xilazina (na forma de cloridrato) 20 mg/mL fabricado por “*Rhobifarma Industria Farmacêutica LTDA*”, nas doses de 75mg/kg 15mg/kg respectivamente.

Após isso, o animal foi deixado em repouso até apresentar sinais de letargia. A verificação do estágio anestésico foi feita colocando-se o animal em decúbito dorsal e, este não apresentando resistência à posição, testaram-se os reflexos dos seus membros superiores e inferiores por compressão com pinça. Com animal não apresentando sinais reflexos foi realizada então a punção na região ventricular, coletando-se assim o sangue, que é 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 congelado a -20°C para posterior utilização.

4.4 Equipamentos

4.4.1 Sistema Cromatográfico

As amostras foram analisadas utilizando um sistema de CLAE (Shimadzu, Japão) consistindo de uma bomba (modelo LC-10AD), sistema de injeção manual, detector por ultravioleta fixo (modelo SPD-10), operado pelo software LCSolutions, rodando em Windows Vista, para aquisição de dados.

4.4.2 Aparelho para Obtenção de Água Ultra-Pura

Foi utilizado um aparelho Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation para obtenção da água ultra-pura.

4.4.3 Balança de Precisão

Para a pesagem de todos os materiais desse estudo foi utilizada uma balança analítica do fabricante SARTORIUS modelo BP 121 S, de peso máximo 120g e mínima divisão 0,1mg.

4.4.4 Espectrômetro de Massas

Para confirmação da identidade tanto do LPSF/AC-23 como do PI foi utilizado um Espectrometro de Massas Shuimadzu Modelo LCMS – IT – TOF, com ionização por Electrospray (ESI) operando no modo positivo e negativo.

4.4.5 Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H¹)

Para confirmação da identidade e pureza da amostra do LPSF/AC-23 e do PI foi utilizado um RMN H¹ Varian Unity-Plus de 300MHz, com o magneto fabricado pela Oxford.

4.5 Geração dos Descritores do LPSF/AC-23

Por se tratar de uma molécula nova, para prosseguir com o delineamento do estudo aqui proposto, é necessário determinar o valor de alguns descritores (características químicas como LogP e pKa) que serão de extrema importância para a orientação em relação a parâmetros que terão de ser definidos durante o decorrer deste estudo.

Para gerar esses descritores, foi usado um banco de dados reconhecido na comunidade científica, e o mais indicado (pois existem outros como, por exemplo, o VCCLab) quando de quer estimar o valor de LogP e pKa de uma molécula: o “*Chemicalize*” da ChemAxon. Usando um software de modelagem molecular, inserimos dados como a fórmula e estrutura molecular do LPSF-AC/23 e então pede-se para ele calcular os descritores da molécula.

4.6 Testes de Solubilidade

Para se verificar a solubilidade do LPSF/AC-23 foi preparado soluções nas concentrações de 1mg/mL e 0,5mg/mL do fármaco nos seguintes solventes/soluções: metanol, etanol, acetona, acetato de etila, acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e água (50:50 v/v), etanol e água (50:50 v/v), acetona e água (50:50 v/v), acetato de etila e água (50:50 v/v) e acetonitrila e água (50:50 v/v). Os parâmetros de solubilidade seguiram o que preconiza a Farmacopéia Brasileira.

4.7 Confirmação da Identidade e Pureza da amostra do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por RMN H¹

Faz-se necessário, antes de começar a etapa de pré-validação, confirmar se as amostras do analito e do PI, cedidas pelo Laboratório de Pesquisa e Síntese de Fármacos, encontram-se realmente em um alto grau de pureza (livre de contaminantes), para isso ambas as amostras foram submetidas a testes de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H¹).

Pesou-se 100 mg da amostra do LPSF/AC-23. Essa massa foi dissolvida em DMSO deuterado e então submetida à análise por RMN H¹. A mesma metodologia foi seguida para o teste do PI.

4.8 Confirmação da pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS

Preparou-se soluções do analito e do PI em ACN nas concentrações de 7000 ng/mL e 3000 ng/mL, respectivamente, e as mesmas foram submetidas à análise em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a um Espectrômetro de Massas do tipo “*Ion Trap Time of Flight*” da Shimadzu (LC-MS-IT-TOF).

4.9 Determinação do Comprimento de Onda com Máxima Absorção no Espectro Ultravioleta

A mesma amostra do LPSF/AC-23 e do PI foram submetidas a uma varredura no espectro da radiação ultravioleta-visível realizada pelo LC-MS-IT-TOF (que possui um detector por arranjo de diodos (DAD) para determinação do comprimento de onda de maior absorção no espectro ultravioleta para o LPSF/AC-23 e PI .

4.10 Determinação das Condições Cromatográficas Ideais

4.10.1 Fase Estacionária

Por se tratar de um composto apolar, os estudos preconizam o uso de uma coluna de fase reversa. Por isso a Fase Estacionária (FE) utilizada foi uma coluna Phenomenex tipo Luna C18 (5 μ m, 150mm x 4,6mm).

4.10.2 Fase Móvel

A seguinte metodologia foi utilizada: em um *eppendorf* pesou-se 1 mg do LPSF/AC-23 e completou-se o volume para 1 mL com metanol. Em seguida transferiu-se essa solução para um balão volumétrico de 10 mL, e completou-se o volume obtendo-se uma solução de concentração 100 μ g/mL.

Transferiu-se 50 μ L desta solução para outro *eppendorf* e completou-se o volume para 1 mL com metanol, obtendo-se assim uma solução de concentração 5000 ng/mL.

A mesma metodologia descrita acima foi seguida na preparação da solução do PI de concentração 5000 ng/mL. Esta solução só foi utilizada quando os parâmetros cromatográficos já estavam melhores definidos (corridas de 10 minutos).

A solução de concentração 5000 ng/mL de LPSF/AC 23 foi então injetada no cromatográfico utilizando diferentes FM, mantendo-se constantes outros parâmetros como temperatura (40°C), pH (6,0) e Fluxo (1mL/min).

As FM testadas foram:

- Metanol/Tampão Fosfato (5mM) (50:50 v/v)
- Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (50:50 v/v)
- Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (70:30 v/v)
- Metanol/Tampão Fosfato (5mM) (85:15 v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (30:40:30 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (40:40:20 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (20:70:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (30:60:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (40:50:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (50:40:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (60:30:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (70:20:10 v/v/v)
- Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato (5mM) (30:55:15 v/v/v)

4.10.3 Temperatura

Para se determinar a influência da temperatura no método que está sendo validado, foram realizadas duas series de corridas: uma utilizando como FM Metanol/ACN/Tampão Fosfato 5mM (70:20:10 v/v/v) e outra utilizando como FM ACN/Metanol/Tampão Fosfato 5mM (55:30:15 v/v/v). Em ambas as séries cromatográficas manteve-se constante os valores de pH (6,0) e fluxo (1mL/min).

A temperatura do método foi alterada utilizando-se o software LCsolutions e os valores analisados foram: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C. Para cada valor de temperatura foram realizadas três corridas.

Nos testes de temperatura, todas as corridas foram feitas já se utilizando o Padrão Interno que seria usado no estudo.

4.10.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para se determinar a influência do pH no método que está sendo validado, foram realizadas duas series de corridas: uma utilizando como FM Metanol/ACN/Tampão Fosfato 5mM (70:20:10 v/v/v) e outra utilizando como FM ACN/Metanol/Tampão Fosfato 5mM (55:30:15 v/v/v). Em ambas séries cromatográficas a temperatura foi mantida no valor de 40°C e o fluxo em 1mL/min.

Para alterar os valores de pH da FM foram utilizadas duas soluções aquosas: uma ácida (solução de ácido fórmico à 1%) e uma básica (solução de hidróxido de sódio à 1%). Escolheu-se a concentração de 1%, pois foi a que apresentou a melhor relação entre a capacidade de alteração do pH e quantidade da solução adicionada (de modo a se usar somente poucas gotas das soluções).

Os valores de pH analisados foram: 5.0, 6.0, 7.0 e 8.0. Para cada valor foram realizadas três corridas.

Nos testes de pH, todas as corridas foram feitas já se utilizando o Padrão Interno que seria usado no estudo.

4.10.5 Fluxo

Esta variável cromatográfica foi mantida constante durante todo o estudo, pois o valor de 1 mL/min já é um valor alto para as análises por LC-UV e qualquer alteração que viesse a diminuir esse valor iria acarretar em um aumento no tempo de retenção do analito o que não é desejável.

4.11 Determinação do Melhor Método de Extração

Os procedimentos de extração das amostras descritos a seguir serão aplicados não somente nesta etapa de pré-validação, mas também para os padrões das curvas de calibração e amostras de controle de qualidade.

4.11.1 Extração por Precipitação Usando Acetonitrila como Agente Precipitante

- **Preparo da Solução Mãe do Analito:** Uma massa correspondente à 1 mg do LPSF/AC-23 foi cuidadosamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Completamos o volume com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 100 μ /mL.

- **Preparo da Solução Mãe do Padrão Interno (PI):** Uma massa correspondente à 1mg do LPSF/GQ-113B foi cuidadosamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Completamos o volume com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 100 μ g/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 1 (ST AC1):** Transferiu-se 300 μ L da Solução Mãe do AC-23 para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultrapura para obtenção de uma solução de concentração 3000ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 2 (ST AC2):** Transferiu-se 500 μ L da Solução Mãe do AC-23 para um *ependorf* de 2mL e completou-se o volume com água ultrapura até 1 mL para obtenção de uma solução de concentração 50.000 ng/ml.

- **Preparo da Solução de Trabalho 3 (ST AC3):** Transferiu-se 800 μ L da Solução Mãe para um *ependorf* de 2 mL e completou-se o volume com água ultrapura até 1 mL para obtenção de uma solução de concentração 80.000 ng/ml.

- **Preparo da Solução de Trabalho do Padrão Interno 1 (ST PI 1):** Transferiu-se 200 μ L da Solução Mãe do PI para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 2.000 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho do Padrão Interno 2 (ST PI 2):** Transferiu-se 300 μ L da Solução Mãe do PI para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 3.000 ng/mL.

- **Contaminação do Plasma:** Em três *ependorfs* distintos, foram transferidos 560 μ L de um plasma branco para cada um deles. Depois, no primeiro *ependorf* transferiu-se 70 μ L da ST AC1; no segundo 70 μ L da ST AC2 e no terceiro 70 μ L da ST AC3, para obtenção de plasmas contaminados nas concentrações de 300 ng/mL, 5000 ng/mL e 8000 ng/mL respectivamente. Os três *ependorfs* foram então, com auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos.

- **Preparação das Soluções Padrão:** Separaram-se três *ependorfs* distintos. No primeiro foi adicionado 100 μL da ST AC1, no segundo 100 μL da ST AC2 e no terceiro 100 μL da ST AC3. Completou-se o volume para 1 mL com acetonitrila nos três *ependorfs* de modo a se obter soluções padrões de concentrações 300 ng/mL, 5000 ng/mL e 8000 ng/mL respectivamente.

- **Etapa de Extração das Amostras:** Transferiu-se 100 μL dos plasmas contaminados (300 ng/mL 5000 ng/mL e 8000 ng/mL) para três *ependorfs* distintos. A essas soluções plasmáticas foi adicionado 300 μL de uma solução de acetonitrila contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ do PI (ST PI 1). Então as soluções foram, com auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos e, após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante de cada concentração plasmática foi então transferido para *ependorfs* distintos para serem depois injetados no cromatógrafo. Essa etapa foi feita em quintuplicata.

- **Etapa de Contaminação dos Plasmas Branco Após a Extração:** Transferiu-se 100 μL de um plasma branco para quinze *ependorfs* distintos. A esses plasmas foi adicionado 200 μL de uma solução de acetonitrila contendo 3 $\mu\text{g/mL}$ do PI (ST PI 2). Os tubos foram então, com auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos e, após isso, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante foi então transferido para *ependorfs* distintos divididos em três grupos de cinco. No primeiro grupo transferiu-se 100 μL da solução padrão de concentração 300 ng/ml para cada *ependorf*, no segundo grupo, 100 μL da solução padrão de concentração 5000 ng/ml para cada *ependorf* e no terceiro grupo, 100 μL da solução padrão de concentração 8000 ng/mL para cada *ependorf*. Todos os *ependorfs* foram então vortexados e depois foram injetados no cromatógrafo.

4.11.2 Extração por Precipitação Usando Metanol Como Agente Precipitante

Foram feitos os mesmos passos descritos no item 4.11.1, com exceção do agente precipitante e do solvente usado na preparação dos padrões, onde a acetonitrila foi substituída pelo metanol. A etapa de extração das amostras e dos padrões foi feita em quintuplicata.

4.11.3 Extração por Precipitação Usando Ácido Tricloroacético Como Agente Precipitante

Foram feitos os mesmos passos descritos no item 4.11.1, com exceção do agente precipitante e do solvente usado na preparação dos padrões, onde a acetonitrila foi substituída por uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 10%. A etapa de extração das amostras e dos padrões foi feita em quintuplicata.

4.11.4 Extração Líquido-Líquido (ELL)

As etapas de preparação das “Soluções Mãe”, das “Soluções Trabalho” e “Soluções Padrões” do AC e do PI seguiram os mesmos passos descritos no item 4.11.1.

- **Etapa de Extração das Amostras:** Transferiu-se 100 μL dos plasmas contaminados (300 ng/mL 5000 ng/mL e 8000 ng/mL) para três *ependorfs* distintos. A essas soluções plasmáticas foi adicionado 500 μL de uma solução de acetato de etila contendo 1,2 $\mu\text{g/mL}$ do PI. As soluções foram então, com o auxílio de um vortex, agitadas por 5 minutos e, após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. A camada orgânica superior de cada concentração (300 ng/mL 5000 ng/mL e 8000 ng/mL) foi cuidadosamente removida para *ependorfs* distintos. Os tubos com a camada orgânica foram então levados para sofrerem evaporação sob nitrogênio até total secura. Após isso, as amostras foram ressuspensas com 100 μL de acetonitrila, vortexadas por 30 segundos e finalmente injetadas no cromatógrafo. Essa etapa foi feita em quintuplicata.

- **Etapa de Contaminação dos Plasmas Brancos Após a Extração:** Transferiu-se 100 μL de um plasma branco para quinze *ependorfs* distintos. A esses plasmas foi adicionado 500 μL de acetato de etila contendo 1,2 $\mu\text{g/mL}$ do PI. As soluções foram então, com o auxílio de um vortex, agitadas por 5 minutos e deixadas em repouso por 20 minutos. Após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. A camada orgânica superior de cada tubo foi cuidadosamente removida para *ependorfs* distintos. Os tubos com a camada orgânica foram então levados para sofrerem evaporação sob nitrogênio até total secura. Os quinze tubos foram então divididos em três grupos de cinco. No primeiro grupo transferiu-se 100 μL da solução padrão de concentração 300

ng/mL para cada *eppendorf*, no segundo grupo, 100 µL da solução padrão de concentração 5000 ng/mL para cada *eppendorf* e no terceiro grupo, 100µL da solução padrão de concentração 8000 ng/mL para cada *eppendorf*. Todos os *eppendorfs* foram então, com o auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos e depois foram injetados no cromatógrafo.

4.12 Verificação da Seletividade do Método

Para verificar se o método é seletivo, uma amostra de plasma não contaminada foi separada e extraída pelo método de precipitação protéica por ACN. O sobrenadante foi, então, separado e injetado no LC-UV utilizando-se duas FMs a título de comparação, a saber: ACN/Metanol/Tampão Fosfato 5 mM (20:70:10 v/v/v) e (55:30:15 v/v/v). Nesta etapa se observa a presença de algum interferente na janela de eluição do analito e/ou do PI.

4.13 Determinação do Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior

O LD e o LIQ foram determinados, com o auxílio do software, através de diluições sucessivas de soluções plasmáticas com o analito e PI até atingirem a relação sinal/ruído determinado pela legislação, a saber: para o LD (3:1) e para o LIQ (5:1).

4.14 Construção da Curva de Calibração para Determinação da Linearidade do Método

Os procedimentos aqui descritos serão adotados para a construção de todas as curvas de calibração deste estudo.

- **Preparo da Solução Mãe do Analito:** Uma massa correspondente a 1 mg do LPSF/AC-23 foi cuidadosamente pesada em um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume para 10 mL com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 100 µg/mL.

- **Preparo da Solução Mãe do Padrão Interno (PI):** Uma massa correspondente a 1 mg do LPSF/GQ-113B foi cuidadosamente pesada em um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume para 10 mL com acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 100 µg/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 1 (ST AC1):** Transferiu-se 100 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultra-pura para obtenção de uma solução de concentração 1000 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 2 (ST AC2):** Transferiu-se 250 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultra-pura para obtenção de uma solução de concentração 2500 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 3 (ST AC3):** Transferiu-se 750 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultra-pura para obtenção de uma solução de concentração 7500 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 4 (ST AC4):** Transferiu-se 150 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um eppendorf de 2 mL e completou-se o volume com água ultra-pura até 1 mL para obtenção de uma solução de concentração 15.000 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 5 (ST AC5):** Transferiu-se 300 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um eppendorf de 2 mL e completou-se o volume com água ultra-pura até 1 mL para obtenção de uma solução de concentração 30.000 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho 6 (ST AC6):** Transferiu-se 600 µL da Solução Mãe do LPSF/AC-23 para um eppendorf de 2 mL e completou-se o volume com água ultra-pura até 1mL para obtenção de uma solução de concentração 60.000 ng/mL.

- **Preparo da Solução de Trabalho do Padrão Interno 1 (ST PI 1):** Transferiu-se 200 µL da Solução Mãe do PI para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água acetonitrila para obtenção de uma solução de concentração 2µg/mL.

- **Contaminação do Plasma:** Em sete *eppendorfs* distintos, foram transferidos 270 µL de um plasma branco para cada um deles. Depois, no primeiro *eppendorf*

transferiu-se 30 μL da ST AC1; no segundo 30 μL da ST AC2; no terceiro 30 μL da ST AC3; no quarto 30 μL da ST AC4; no quinto 30 μL da ST AC5; no sexto 30 μL da ST AC6 e no sétimo 30 μL da Solução Mãe do LPSF/AC23 para a obtenção de plasmas contaminados nas concentrações de **100 ng/mL, 250 ng/mL, 750 ng/mL, 1500 ng/mL, 3000 ng/mL, 6000 ng/mL e 10000 ng/mL**, respectivamente. Os sete *ependorfs* foram então, com o auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos.

Em seguida transferiu-se 100 μL dos plasmas contaminados (100 ng/mL, 250 ng/mL, 750 ng/mL, 1500 ng/mL, 3000 ng/mL, 6000 ng/mL e 10000 ng/mL) para sete *ependorfs* distintos. A essas soluções plasmáticas foi adicionado 300 μL de uma solução de acetonitrila contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ do PI (ST PI 1). Então as soluções foram, com o auxílio de um vortex, agitadas por 30 segundos e, após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante de cada concentração plasmática foi então transferido para *ependorfs* distintos para serem depois injetados no cromatógrafo. Essa etapa foi feita em duplicata.

Foram construídas três curvas de calibração no mesmo dia (intra-dia), dando-se um intervalo de uma hora entre a construção de uma curva e outra, e três curvas de calibração em dias distintos (inter-dias).

Para ser considerado linear o método deverá atingir os parâmetros mínimos descritos no “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” (BRASIL, 2003) que são:

- O menor ponto da curva ou Limite Inferior de Quantificação (LIQ) deve ter desvio \leq a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal;
- Desvio \leq a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros pontos da curva de calibração;
- No mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

4.15 Determinação da Precisão e Exatidão do Método

4.15.1 Precisão e Exatidão Intra-dia

Foram preparadas três soluções plasmáticas distintas de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000ng/mL (CQM) e 8000ng/mL (CQA) respectivamente. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Contaminação do Plasma” do item 4.11.1.

Em seguida Transferiu-se 100µL dos plasmas contaminados (300 ng/mL 5000 ng/mL e 8000 ng/mL) para três *eppendorfs* distintos. A essas soluções plasmáticas foi adicionado 300µL de uma solução de acetonitrila contendo 2 µg/mL do PI (ST PI 1). Então as soluções foram, com o auxílio de um vortex, agitadas por 30 segundos e, após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante de cada concentração plasmática foi então transferido para *eppendorfs* distintos para serem depois injetados no cromatógrafo. Essa etapa foi feita em octuplicata (n=8).

Foram realizadas três corridas no mesmo dia, com um intervalo de uma hora entre cada corrida.

Para ser considerado preciso o método deverá atingir os parâmetros mínimos descritos no “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” (BRASIL , 2003) que são:

- As concentrações testadas (CQB, CQM e CQA) deverão ter valores de desvio padrão relativo (DPR) \leq a 15% (quinze por cento).

4.15.2 Precisão e Exatidão Inter-dias

Foi seguida a mesma metodologia descrita no item 4.15.1, mas as corridas foram realizadas em dias distintos.

4.16 Determinação da Recuperação do Método

Este teste foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação foi feito em função da

relação de área da amostra extraída e o padrão não extraído, tanto para o analito quanto para o PI separadamente. A seguir, a metodologia detalhada deste processo:

- **Preparação dos Padrões (plasmas branco contaminados após a extração):**

Transferiu-se 100 μL de um plasma branco para quinze *eppendorfs* distintos. A esses plasmas foram adicionados 200 μL de uma solução de acetonitrila contendo 3 $\mu\text{g/mL}$ do PI (ST PI 2). Os tubos foram então, com o auxílio de um vortex, agitados por 30 segundos e, após isso, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante foi então transferido para *eppendorfs* distintos divididos em três grupos de cinco. No primeiro grupo transferiu-se 100 μL da solução padrão de concentração 300 ng/mL para cada *eppendorf*, no segundo grupo, 100 μL da solução padrão de concentração 5000 ng/mL para cada *eppendorf* e no terceiro grupo, 100 μL da solução padrão de concentração 8000 ng/mL para cada *eppendorf*. Todos os *eppendorfs* foram então, com o auxílio de um vortex, agitados e depois foram injetados no cromatógrafo. Os resultados obtidos nesta etapa correspondem a 100% de recuperação.

- **Preparação das Amostras:** Foram preparadas três soluções plasmáticas distintas de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000ng/mL (CQM) e 8000ng/mL (CQA) respectivamente. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Contaminação do Plasma” do item 4.11.1.

Em seguida Transferiu-se 100 μL dos plasmas contaminados (300 ng/mL 5000 ng/mL e 8000 ng/mL) para três *eppendorfs* distintos. A essas soluções plasmáticas foi adicionado 300 μL de uma solução de acetonitrila contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ do PI (ST PI 1). Então as soluções foram, com o auxílio de um vortex, agitadas por 30 segundos e, após isso, centrifugou-se as mesmas por 10 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante de cada concentração plasmática foi então transferido para *eppendorfs* distintos para serem depois injetados no cromatógrafo. Esta etapa foi feita em quintuplicata e os resultados obtidos correspondem à recuperação do método.

4.17 Determinação da Estabilidade do Analito na Matriz Biológica

4.17.1 Estabilidade Após Ciclos de Congelamento e Descongelamento

- **Preparação das Amostras:** Foram preparadas três soluções plasmáticas distintas de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000 ng/mL e 8000ng/mL (CQA) respectivamente. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Contaminação do Plasma” do item 4.11.1.

Essas amostras foram então congeladas a -20°C e mantidas no congelador por 24 horas. Em seguida, as mesmas foram submetidas ao descongelamento a temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C e novamente armazenadas no congelador por 24 horas. Repetiu-se o processo mais uma vez, até contemplar três ciclos de congelamento e descongelamento e em seguida as amostras foram quantificadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas. Este teste foi feito em quintuplicata.

4.17.2 Estabilidade de Curta Duração

- **Preparação das Amostras:** Foram preparadas três soluções plasmáticas distintas de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000ng/mL (CQM) e 8000ng/mL (CQA) respectivamente. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Contaminação do Plasma” do item 4.11.1.

As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 6 horas e em seguida foram quantificadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas. Este teste foi feito em quintuplicata.

4.17.3 Estabilidade de Longa Duração

- **Preparação das Amostras:** Foram preparadas três soluções plasmáticas distintas de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000ng/mL (CQM) e 8000ng/mL (CQA) respectivamente. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Contaminação do Plasma” do item 4.11.1.

As amostras permaneceram congeladas a -20°C por 30 dias. Depois deste período foram descongeladas e em seguida quantificadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras preparadas no primeiro dia. Este teste foi feito em quintuplicata.

4.17.4 Estabilidade das Soluções-Padrão

Foram preparadas três soluções-padrão de concentração 300 ng/mL (CQB), 5000ng/mL (CQM) e 8000ng/mL (CQA) em acetonitrila. Este processo seguiu os mesmos passos descritos na etapa “Preparação das Soluções Padrão” do item 4.11.1.

As soluções-padrão foram então imediatamente quantificadas e em seguida foram deixadas a temperatura ambiente por 6 horas. Após esse período elas foram novamente quantificadas. Este teste foi feito em quintuplicata.

Em todos os testes de estabilidade as amostras serão consideradas estáveis se o desvio observado for menor ou igual a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas.

Em todos os testes de estabilidade o PI estava presente nas amostras a uma concentração de 6000ng/mL.

V- RESULTADOS

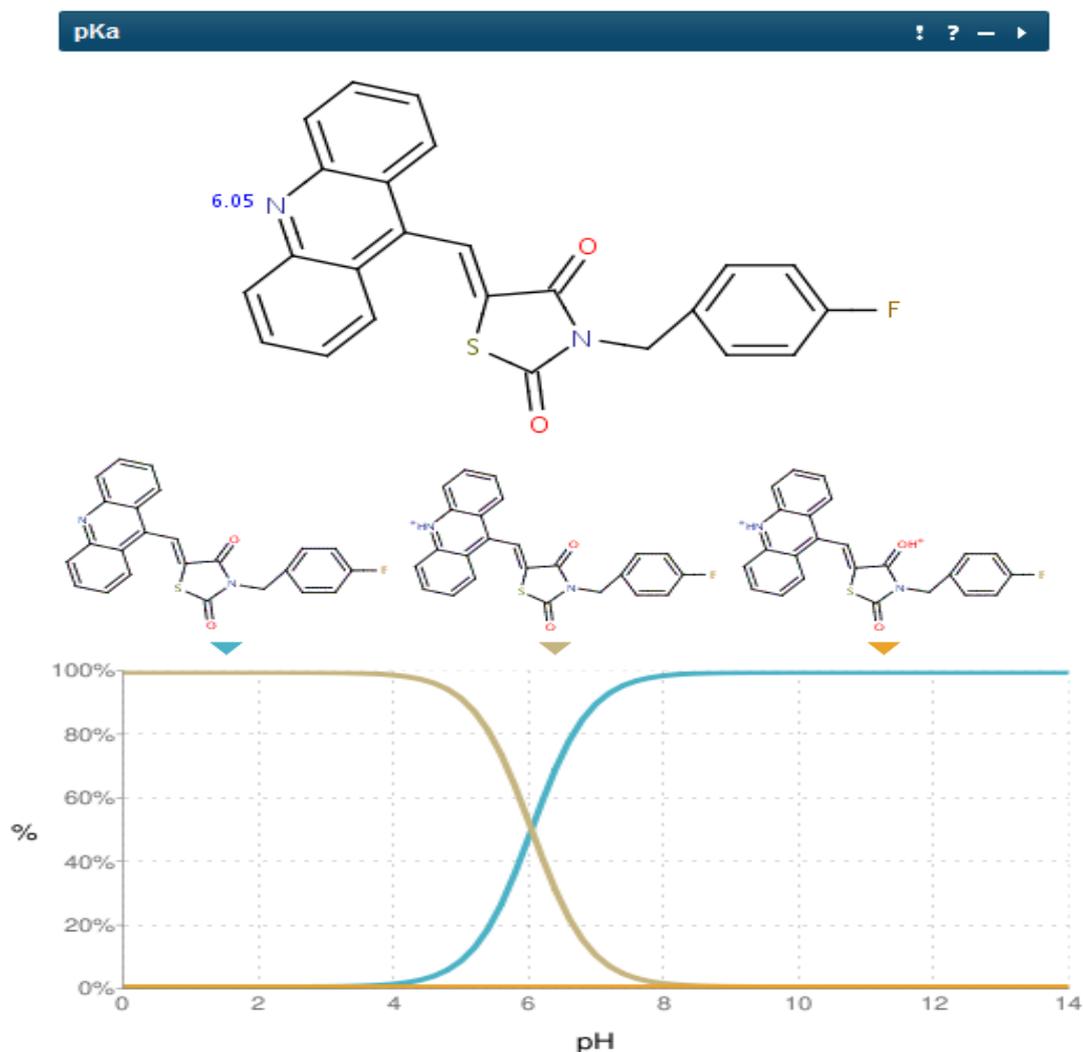
5.1 Descritores do LPSF/AC-23

Os resultados obtidos pelo software de modelagem molecular do *Chemicalize* para os descritores que interessam neste estudo foram:

- LogP: 5.51
- pKa: 6.05

O software ainda gerou uma curva de pH que prediz o comportamento das formas molecular e ionizada da molécula em diferentes pHs (figura 5.1).

FIGURA 5.1: Resultado gerado pelo *Chemicalize* indicando o valor de pKa e as micro-espécies iônicas formadas e o seu equilíbrio na curva de pH.



Fonte: www.Chemicalize.org, 2011.

Esses resultados demonstram que a molécula do LPSF/AC-23 possui uma elevada lipofilicidade, pois apresenta um alto valor de LogP. Baseado nisto, uma predição teórica da composição da FM já pode ser feita, sabendo-se, então, que ela deverá ser composta predominantemente por solventes orgânicos, dada a baixa afinidade do analito por sistemas aquosos. O valor de pKa será útil para a definição da faixa de estudo de pH da fase móvel.

5.2 Testes de Solubilidade

Os resultados são mostrados na tabela abaixo:

TABELA 5.1: Avaliação da solubilidade do LPSF/AC-23 em diferentes solventes/soluções

Solvente/Solução	Concentração	Resultado
Acetato de Etila	1mg/mL	Solúvel
Acetona	1mg/mL	Solúvel
Acetonitrila	0,1mg/mL	Solúvel
Acetonitrila	0,5mg/mL	Solúvel
Acetonitrila	1mg/mL	Solúvel
Dimetilsulfóxido	1mg/mL	Solúvel
Etanol	1mg/mL	Não é solúvel em temperatura ambiente. É solúvel com leve aquecimento.
Metanol	0,1mg/mL	Solúvel
Metanol	0,5mg/mL	Parcialmente solúvel
Metanol	1mg/mL	Não é solúvel em temperatura ambiente. É solúvel com leve aquecimento.
Solução Metanol/Água (50:50 v/v)	1mg/mL	Insolúvel
Solução Etanol/Água (50:50 v/v)	1mg/mL	Insolúvel
Solução Acetona/Água (50:50 v/v)	1mg/mL	Insolúvel
Solução Acetato de Etila/Água (50:50 v/v)	1mg/mL	Insolúvel
Solução Acetonitrila/Água (50:50 v/v)	1mg/mL	Insolúvel

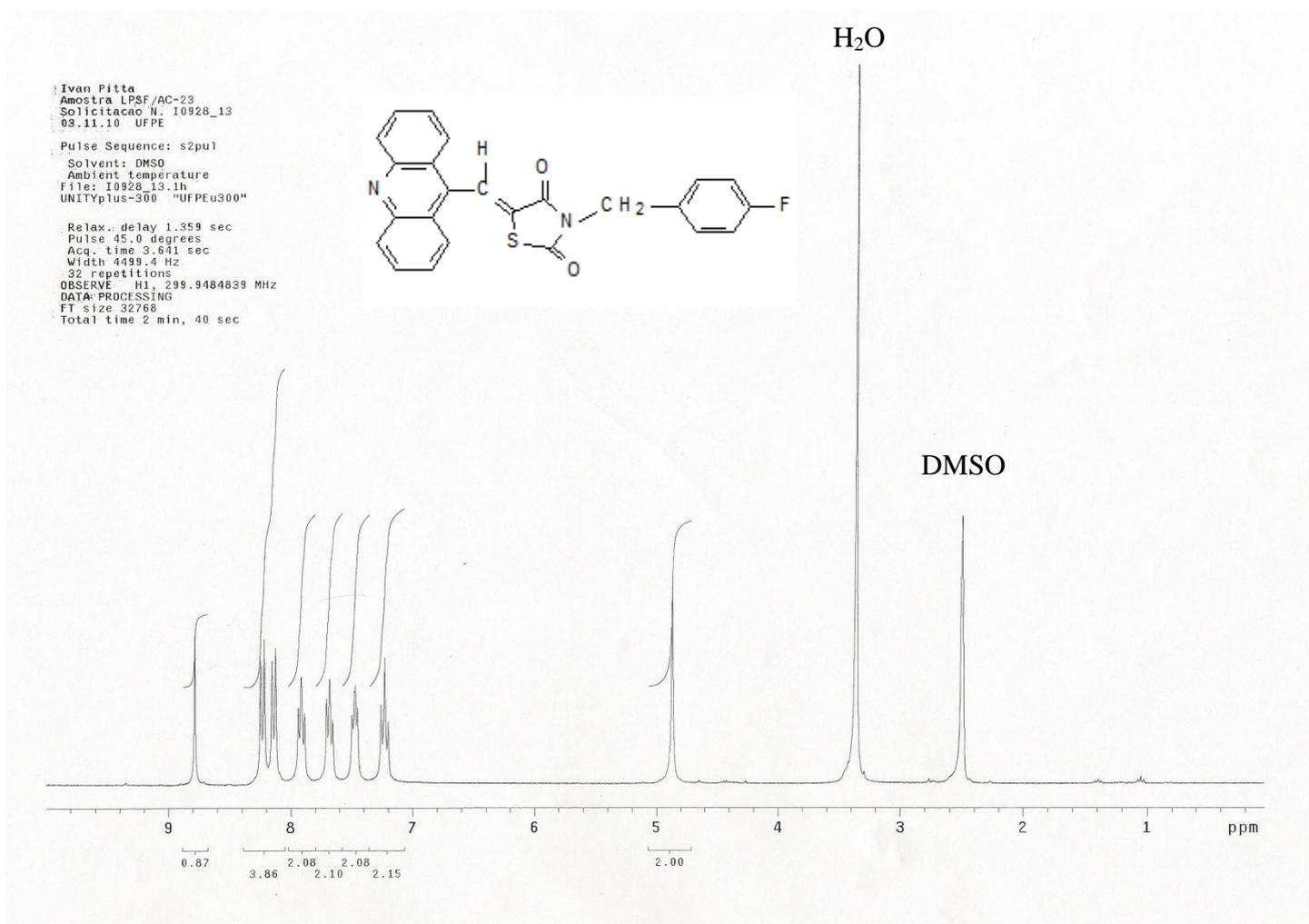
Fonte: Acervo do próprio autor.

Os testes de solubilidade confirmaram o resultado obtido pelo software *Chemicalize* no que diz respeito à alta lipofilicidade do composto e, conseqüentemente a baixa afinidade do mesmo por sistemas aquosos.

5.3 Confirmação da Identidade e Pureza da amostra do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por RMN H¹

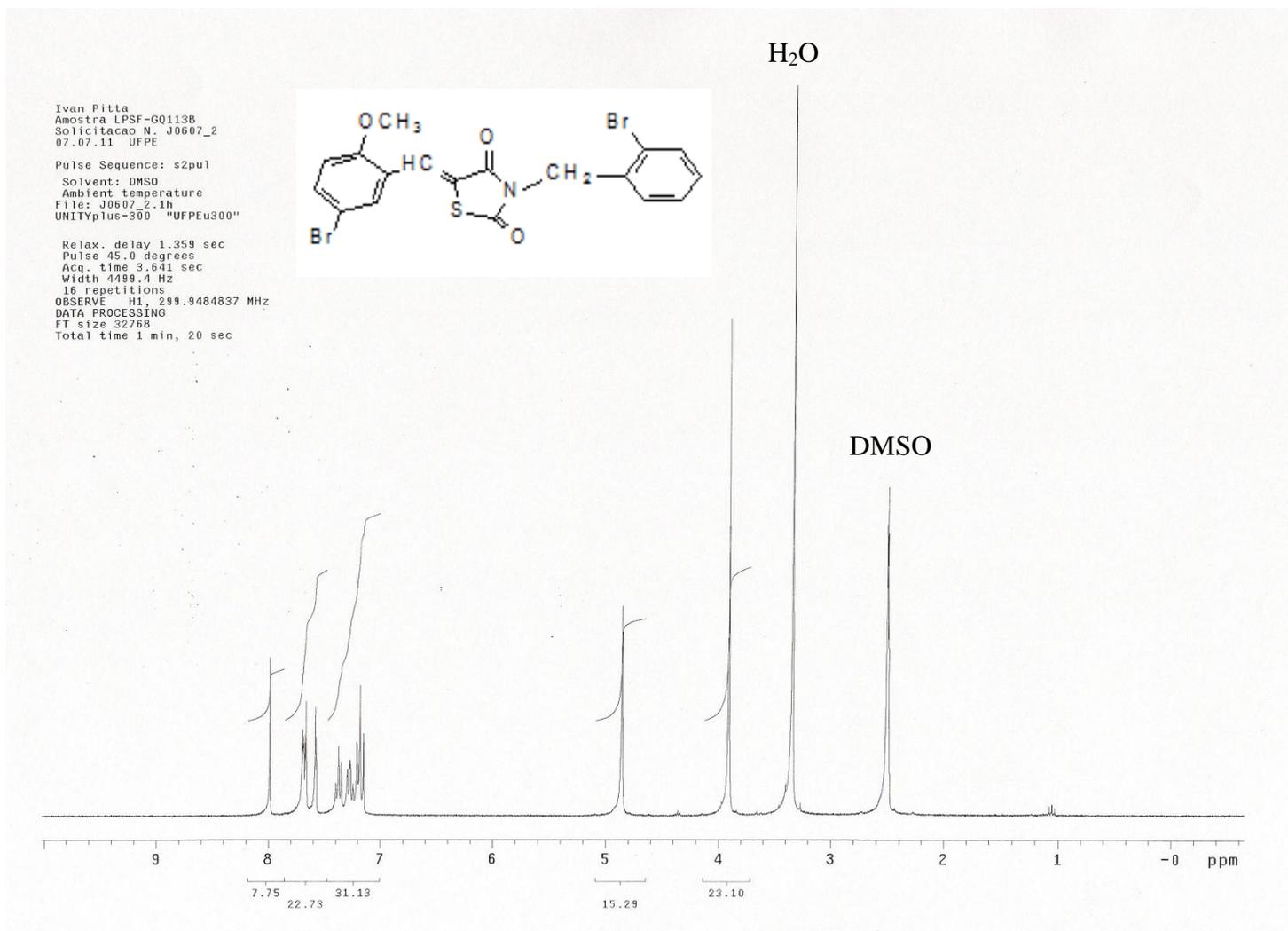
Os resultados dos testes de confirmação da identidade da amostra e do PI, feitos por RMN H¹ na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental são mostrados nas figuras 5.2 e 5.3:

FIGURA 5.2: Espectro de RMH¹ da amostra contendo o composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluoro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona concedida pelo de Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos.



Fonte: Acervo do próprio autor.

FIGURA 5.3: Espectro de RMH¹ da amostra contendo o composto 3-(2-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (PI) concedida pelo de Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos.



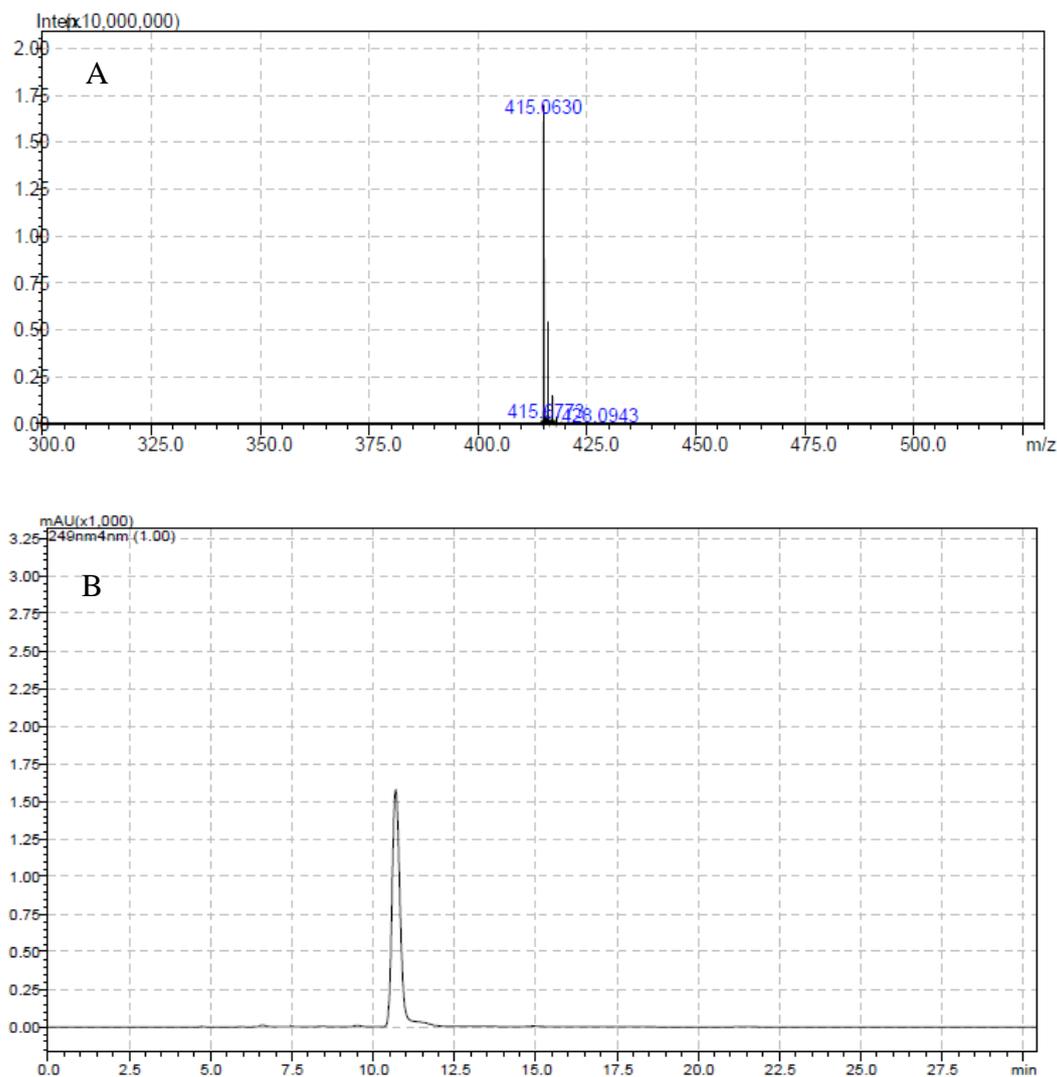
Fonte: Acervo do próprio autor.

Os espectros de RMN H¹ feitos comprovaram que as amostras se tratavam realmente do LPSF/AC-23 e do LPSF/GQ-113B (PI). Ainda, pelo resultado, pode-se afirmar que as amostras estão em um alto grau de pureza, pois quase não são notados sinais extras na linha de base de ambos os espectros, podendo, desta maneira, os estudos de validação ser prosseguidos.

5.4 Confirmação da Pureza do Pico Cromatográfico do LPSF/AC-23 e Padrão Interno por LC-MS

Neste estudo foi utilizada a técnica de ionização branda, portanto, durante a corrida foi-se observado se o íon molecular seria formado. Os pesos moleculares do LPSF/AC-23 e do Padrão Interno são respectivamente: 414,063 e 480,540. Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 5.4 e 5.5:

FIGURA 5.4: Espectro de Massa (A) e Cromatograma (B) da amostra do composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluoro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona na concentração de 7000ng/mL obtido por ESI, modo negativo, a 40°C, pelo LCMS –IT-TOF Shimadzu.



Fonte: acervo do próprio autor.

FIGURA 5.5: Espectro de Massa do PI na concentração de 300 ng/mL com aduto de uma molécula de acetolitrila, obtido por ESI, modo negativo, a 40°C, pelo LCMS – IT-TOF Shimadzu.



Fonte: SILVA, R. M., Dissertação de Mestrado: Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona): Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico.

Pelo resultado mostrado na figura 5.4, observa-se exatamente o peso molecular do LPSF/AC-23 somado de um próton, confirmando, assim, que o pico observado no cromatograma corresponde realmente ao analito.

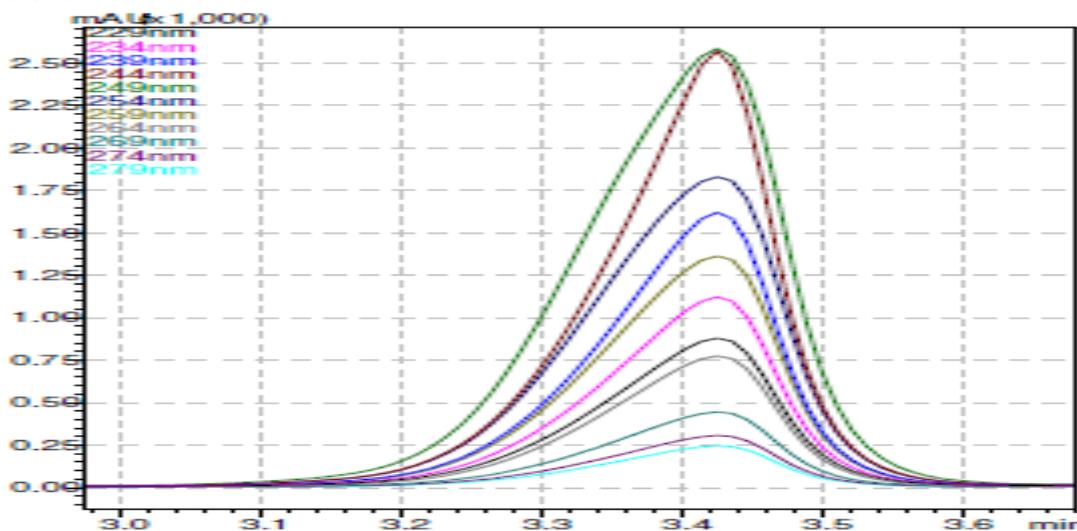
Na figura 5.5 observa-se um valor de 522,5909. A soma da massa molecular do LPSF/GQ-113B (480,5409) mais a massa molecular de uma molécula de acetolitrila (41,05) é igual a 521,5909. Como o espectro de massas foi obtido no modo negativo, então o íon molecular tem a massa do analito adicionado de um próton, sendo exatamente isto o que se observa no histograma, confirmando assim a pureza do pico cromatográfico também para o PI.

Com esses resultados, pode-se então realizar as mudanças na composição da FM e analisar assim a influência dessas alterações no tempo de retenção tanto do analito quanto do PI.

5.5 Determinação do Comprimento de Onda com Máxima Absorção no Espectro Ultravioleta

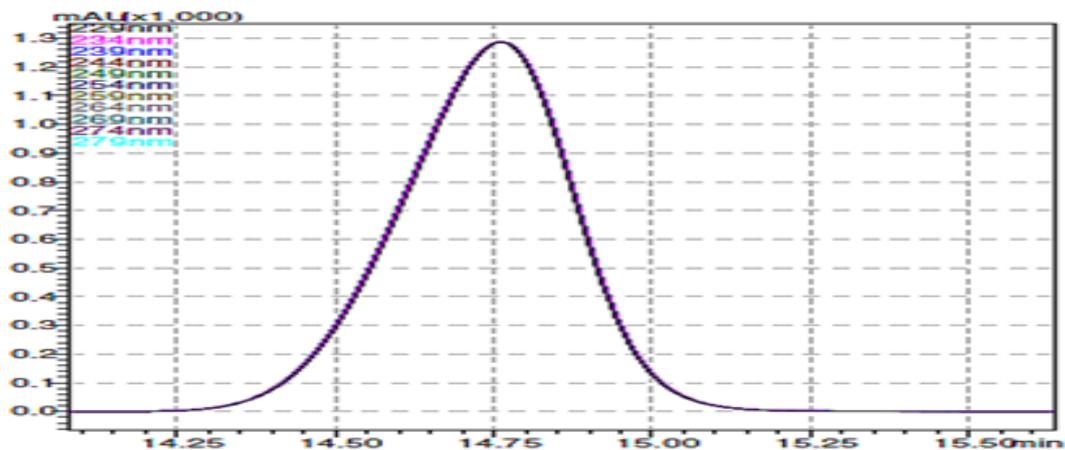
Os resultados da determinação do comprimento de onda de maior absorção no espectro ultravioleta para o LPSF/AC-23 e para o PI são mostrados nas figuras 5.6 e 5.7:

FIGURA 5.6: Cromatogramas da Varredura por Detector de Arranjo de Diodos da amostra contendo o composto 5-acridina-9-ilmetileno-3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: Acervo do próprio autor

FIGURA 5.7: Cromatogramas da Varredura por Detector de Arranjo de Diodos da amostra contendo o composto 3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: SILVA, R. M., Dissertação de Mestrado: Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-

benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) : Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico.

O resultado mostrado na figura 5.6 revela que o comprimento de onda na região do ultravioleta em que o LPSF/AC-23 tem a sua absorção máxima é 249 nm. Já quando se analisa a figura 5.7 observa-se que o PI tem sua absorção máxima na região entre 229 – 279 nm, não havendo uma diferença significativa entre um comprimento e outro nesta região.

Esses resultados são importantes porque mostram que os dois componentes podem ser monitorados no comprimento de onda de absorção máxima do analito (249 nm), condição essencial para que se possa utilizar o LPSF/GQ-113B como PI.

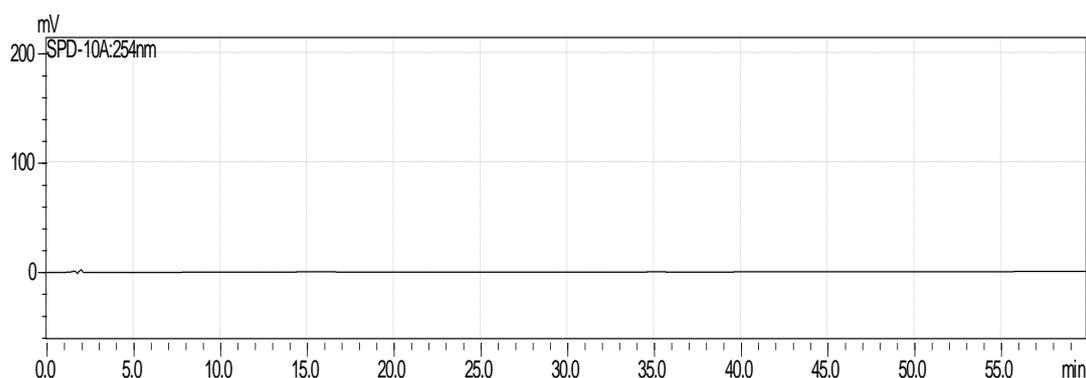
5.6 Determinação das Condições Cromatográficas Ideais

5.6.1 Fase Móvel

- **Fase Móvel Constituída de Metanol e Tampão Fosfato 5mM (50:50 v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 não foi eluído neste intervalo de tempo, como se pode observar na figura 5.8:

FIGURA 5.8: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Tampão Fosfato 5 mM (50:50 v/v)

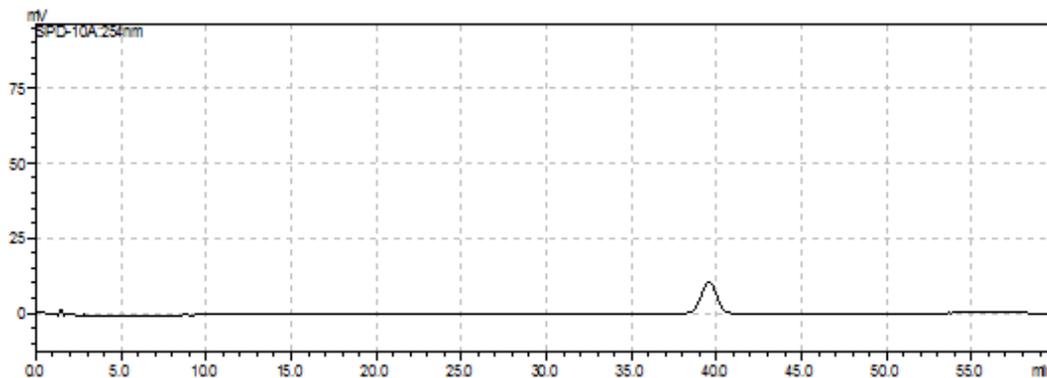


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Acetonitrila e Tampão Fosfato 5mM (50:50 v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 39,55 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.9:

FIGURA 5.9: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (50:50 v/v).

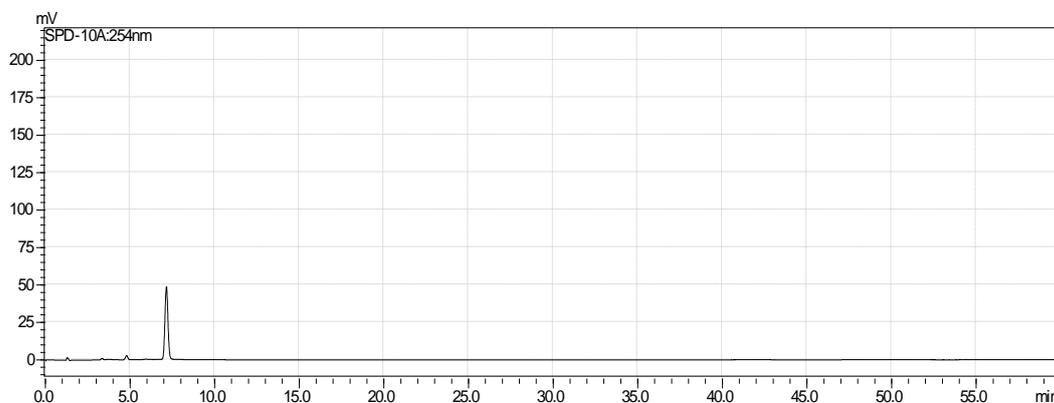


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Acetonitrila e Tampão Fosfato (5mM) (70:30 v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 7,15 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.10:

FIGURA 5.10: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (70:30 v/v).

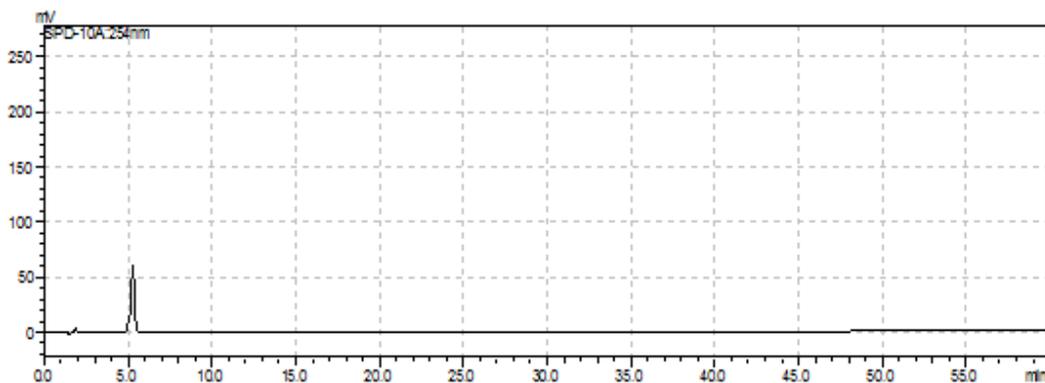


Fonte: acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol e Tampão Fosfato 5mM (85:15 v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 5,13 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.11:

FIGURA 5.11: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Tampão Fosfato 5 mM (85:15 v/v).

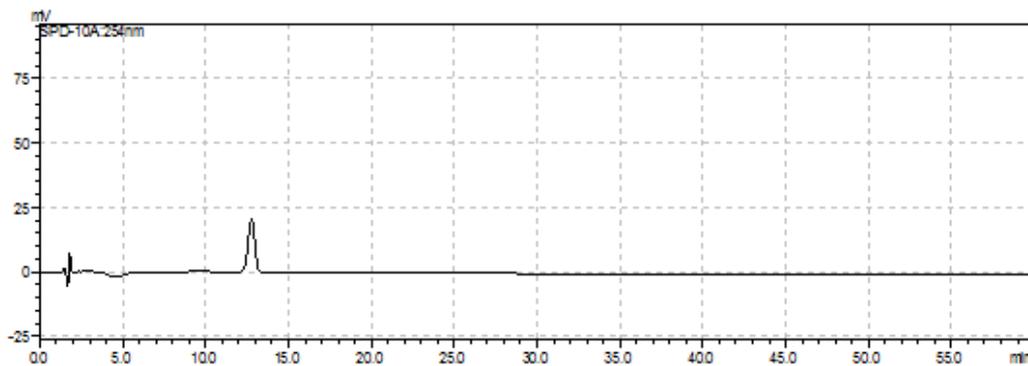


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (30:40:30 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 12,79 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.12:

FIGURA 5.12: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (30:40:30 v/v/v).

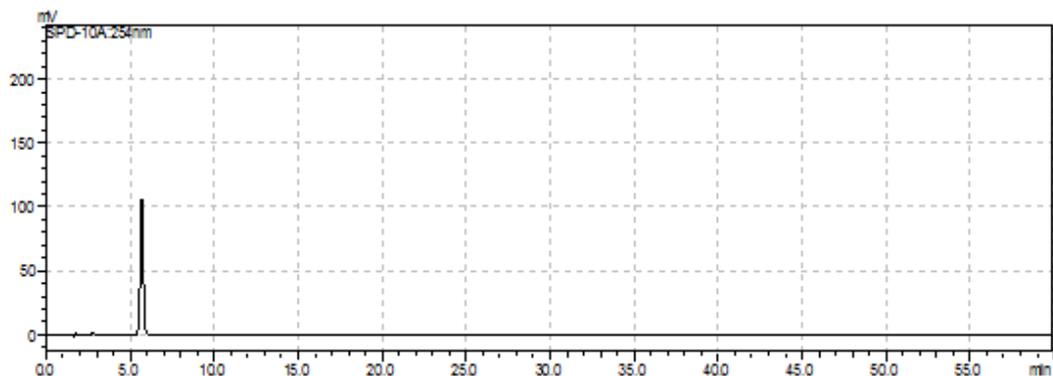


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (40:40:20 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 5,72 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.13:

FIGURA 5.13: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (40:40:20 v/v/v).

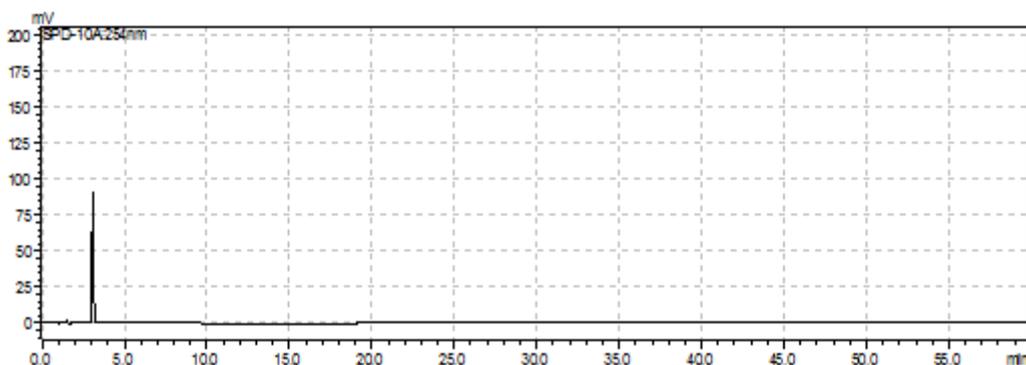


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (20:70:10 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 60 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,02 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.14:

FIGURA 5.14: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (20:70:10 v/v/v).

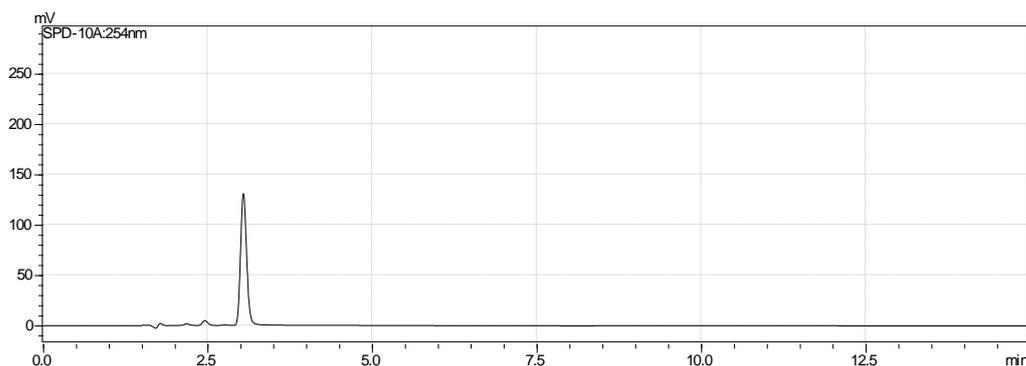


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5mM (30:60:10 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 20 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,09 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.15:

FIGURA 5.15: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (30:60:10 v/v/v).

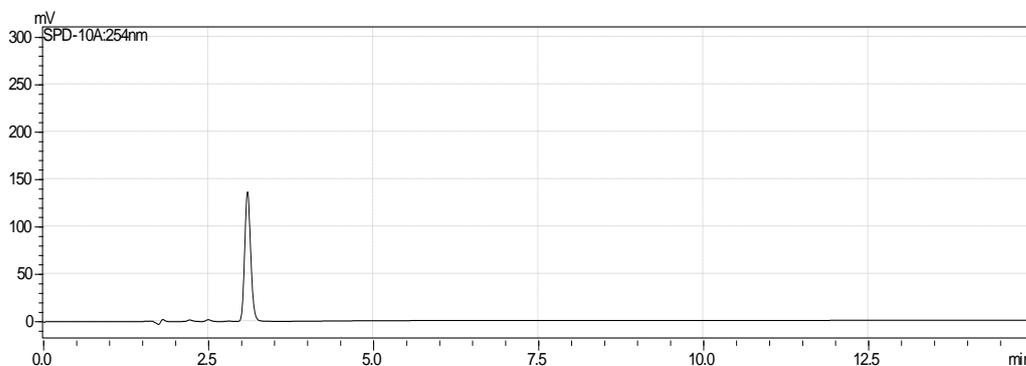


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5mM (40:50:10 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 20 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,11 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.16:

FIGURA 5.16: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (40:50:10 v/v/v).

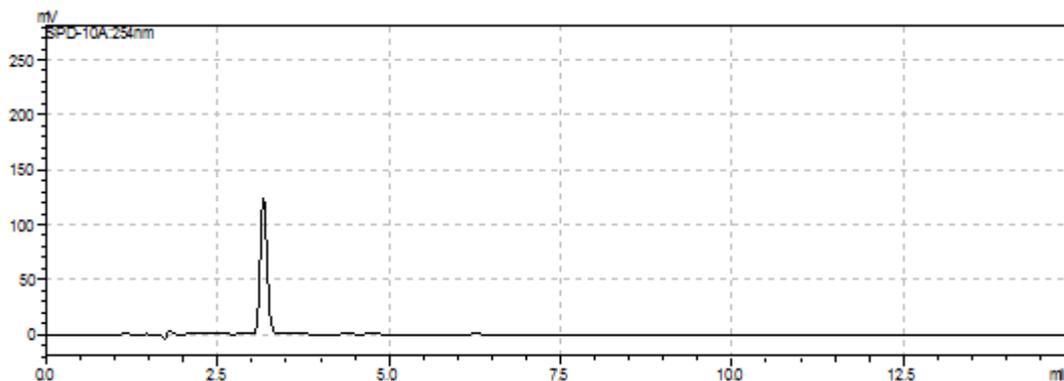


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato (5mM) (50:40:10 v/v)**

Foi realizada uma corrida de 20 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,17 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.17:

FIGURA 5.17: Corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5 mM (50:40:10 v/v/v).

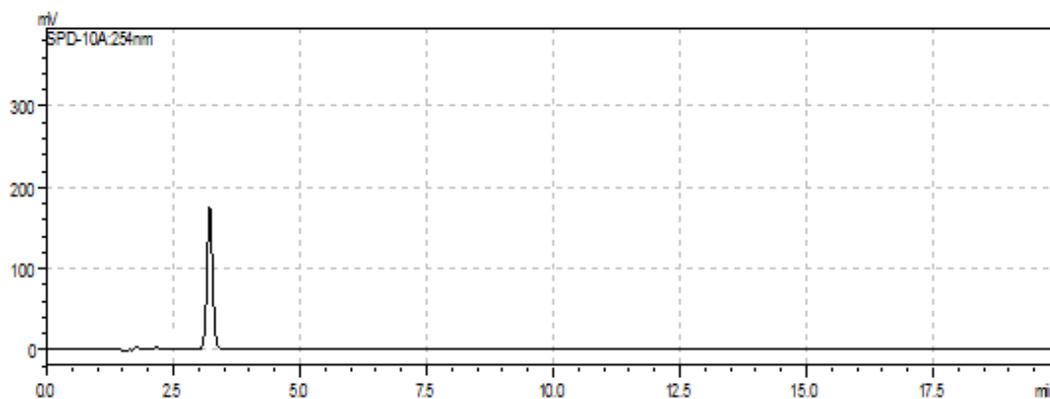


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/ Tampão Fosfato 5mM (60:30:10 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 20 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,22 minutos, e a resolução do pico ficou boa, como se pode observar na figura 5.18:

FIGURA 5.18: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (60:30:10 v/v/v).

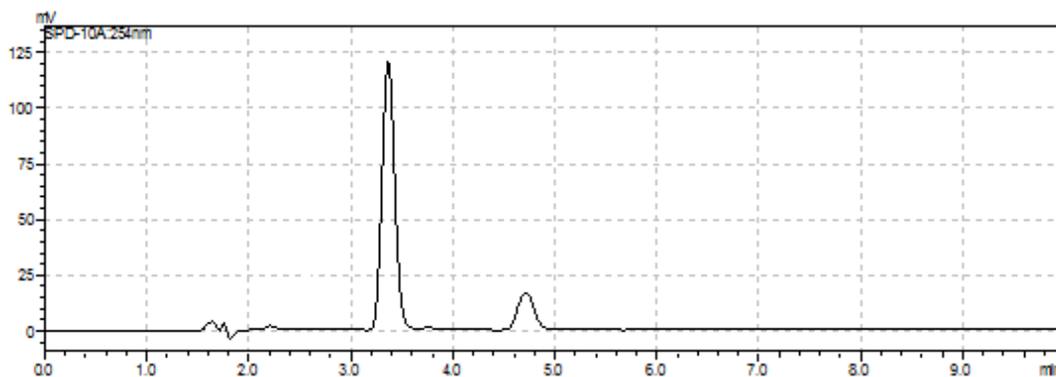


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (70:20:10 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 10 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,39 minutos, e o PI em 4,69 minutos. As resoluções dos picos ficaram boas, como se pode observar na figura abaixo:

FIGURA 5.19: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (70:20:10 v/v/v).

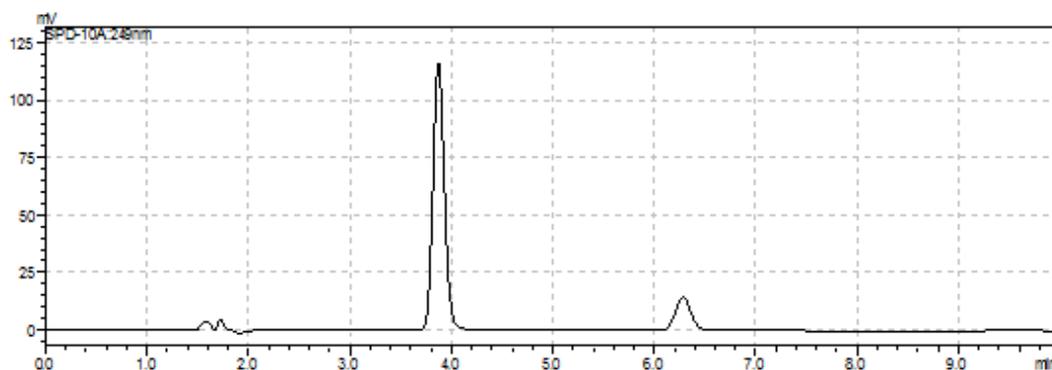


Fonte: Acervo do próprio autor.

- **Fase Móvel Constituída de Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (30:55:15 v/v/v)**

Foi realizada uma corrida de 10 minutos. O LPSF/AC-23 foi eluído em 3,80 minutos, e o PI em 6,15 minutos. As resoluções dos picos ficaram boas, como se pode observar na figura abaixo:

FIGURA 5.20: Cromatograma da corrida realizada utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5mM (30:55:15 v/v/v).



Fonte: Acervo do próprio autor.

Com os resultados obtidos nesta sessão do trabalho, duas FM foram pré-selecionadas para a continuação dos testes de delineamento das condições cromatográficas ideais (definição do pH e Temperatura), a saber:

- i. Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (70:20:10)
- ii. Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (55:30:15)

5.6.2 Temperatura

Nesta sessão, foram realizadas duas series de corridas: uma utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato 5 mM (70:20:10 v/v) e outra utilizando como FM Acetonitrila/Metanol/Tampão Fosfato 5 mM (55:30:15 v/v/v). Ambas as séries cromatográficas foram feitas já com a presença do PI e tiveram uma duração de 10 minutos. O pH da FM foi mantido em 6,0 e o fluxo em 1mL/min. Os resultados são mostrados na tabela 5.2:

TABELA 5.2: Variação do Tempo de Retenção (TR) do LPSF/AC-23 e do PI em função da temperatura

FM Acetonitrila/Metanol/Tampão (70:20:10)			FM Acetonitrila/Metanol/Tampão (55:30:15)		
Temperatura (°C)	TR (min) LPSF/AC-23	TR (min) PI	Temperatura (°C)	TR (min) LPSF/AC-23	TR (min) PI
30	3,50	5,09	30	4,27	7,29
40	3,39	4,69	40	3,87	6,28
50	3,15	4,26	50	3,59	5,52
60	3,01	3,91	60	3,29	4,82
70	2,84	3,61	70	3,05	4,25

Fonte: Acervo do próprio autor.

Analisando-se os resultados obtidos na tabela 5.2, percebe-se que tanto o LPSF/AC-23 quanto o PI tem seus tempos de retenção influenciados de maneira significativa pela mudança no valor de temperatura do experimento e, como era de se esperar, os tempos de retenção são diminuídos à medida que se aumenta o valor da temperatura, devido ao aumento da fluidez da FM.

Assim sendo, a temperatura escolhida como ideal para o método que se está desenvolvendo foi 40°C, por apresentar um tempo de retenção relativamente baixo e não ser uma temperatura que venha a forçar o funcionamento do aparelho (mais especificamente o forno) nem danificar a coluna cromatográfica.

5.6.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Nesta sessão, foram realizadas duas series de corridas: uma utilizando como FM Metanol/Acetonitrila/Tampão Fosfato (5mM) (70:20:10 v/v) e outra utilizando como FM Acetonitrila/Metanol/Tampão Fosfato 5mM (55:30:15 v/v/v). Ambas as séries cromatográficas foram feitas já com a presença do PI e tiveram duração de 10 minutos. A temperatura foi mantida no valor de 40°C e o fluxo em 1mL/min. Os resultados são mostrados na tabela 5.3:

TABELA 5.3: Variação do Tempo de Retenção (TR) do LPSF/AC-23 e do PI em função do pH

FM Acetonitrila/Metanol/Tampão (70:20:10)			FM Acetonitrila/Metanol/Tampão (55:30:15)		
pH	TR (min) LPSF/AC-23	TR (min) PI	pH	TR (min) LPSF/AC-23	TR (min) PI
5.0	3,34	4,69	5.0	3,82	6,19
6.0	3,43	4,88	6.0	3,87	6,23
7.0	3,46	4,88	7.0	3,89	6,36
8.0	3,46	4,94	8.0	3,91	6,42

Fonte: Acervo do próprio autor.

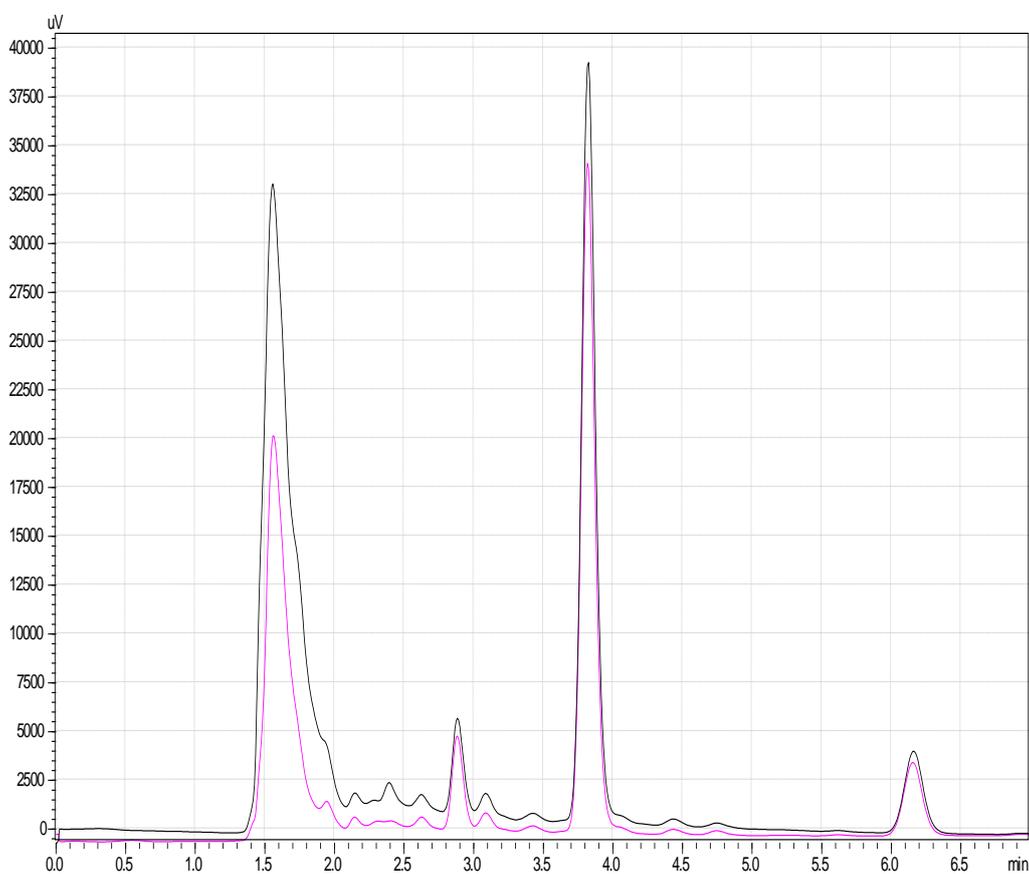
Analisando-se os resultados obtidos na tabela 5.3, percebe-se que tanto o LPSF/AC-23 quanto o PI não tem seus tempos de retenção influenciados pela mudança de pH, já que apenas pequenas alterações nos mesmos são observadas quando se muda esse parâmetro. Deste modo, foi escolhido o valor de pH igual a 6,0 para o restante do estudo.

5.7 Determinação do Melhor Método de Extração

5.7.1 Extração por Precipitação Usando Acetonitrila como Agente precipitante

O resultado da extração das amostras CQB, CQM e CQA comparada com a extração do plasma branco contaminado após a extração foi: **86,83%** para o LPSF/AC-23 e **86,56%** para o PI. O cromatograma da extração é mostrado na figura 5.20:

FIGURA 5.21: Cromatograma da extração pelo método da precipitação protéica por acetonitrila. A linha preta indica o plasma branco contaminado depois da extração, e a linha rosa a amostra CQM (5000ng/mL) extraída:

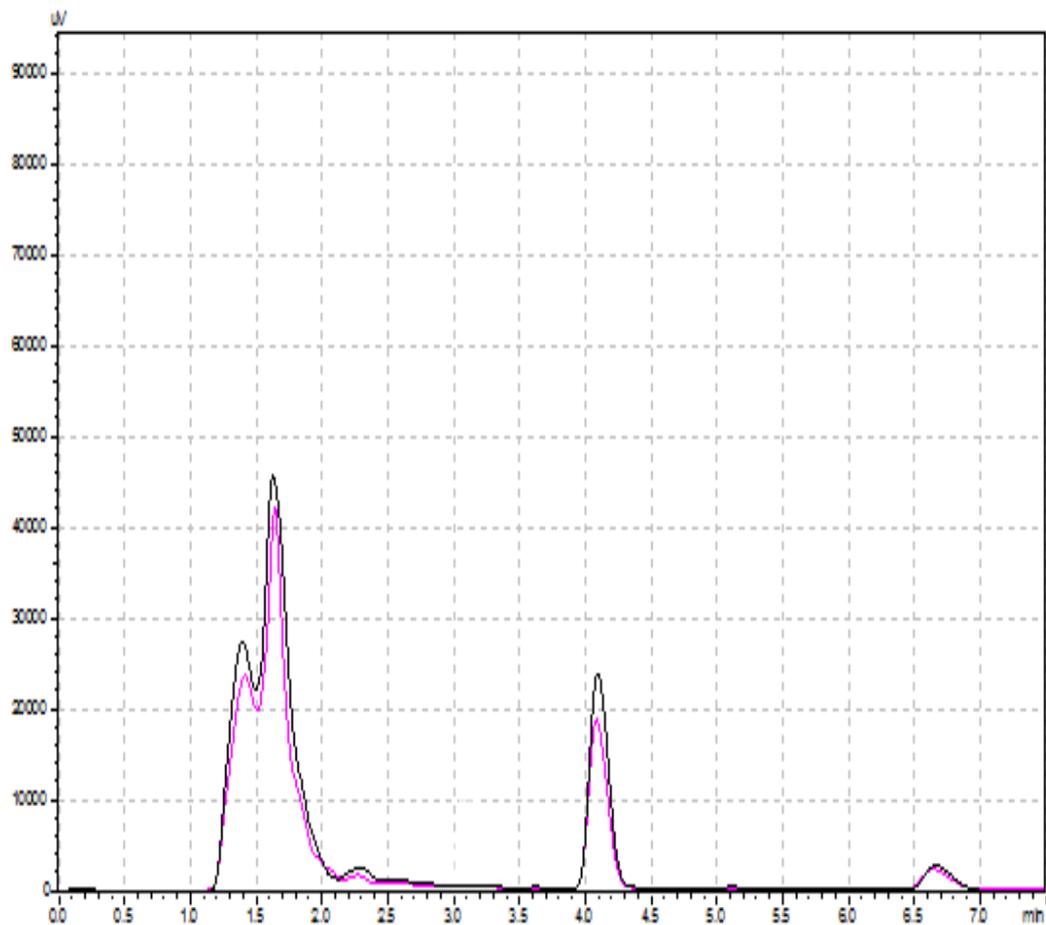


Fonte: Acervo do próprio autor.

5.7.2 Extração por Precipitação Usando Metanol como Agente precipitante

O resultado da extração das amostras CQB, CQM e CQA comparada com a extração do plasma branco contaminado após a extração foi: **74,80%** para o LPSF/AC-23 e **81.68%** para o PI. O cromatograma da extração é mostrado na figura 5.21:

FIGURA 5.22: Cromatograma da extração pelo método da precipitação protéica por metanol. A linha preta indica o plasma branco contaminado depois da extração, e a linha rosa a amostra CQM (5000ng/mL) extraída.

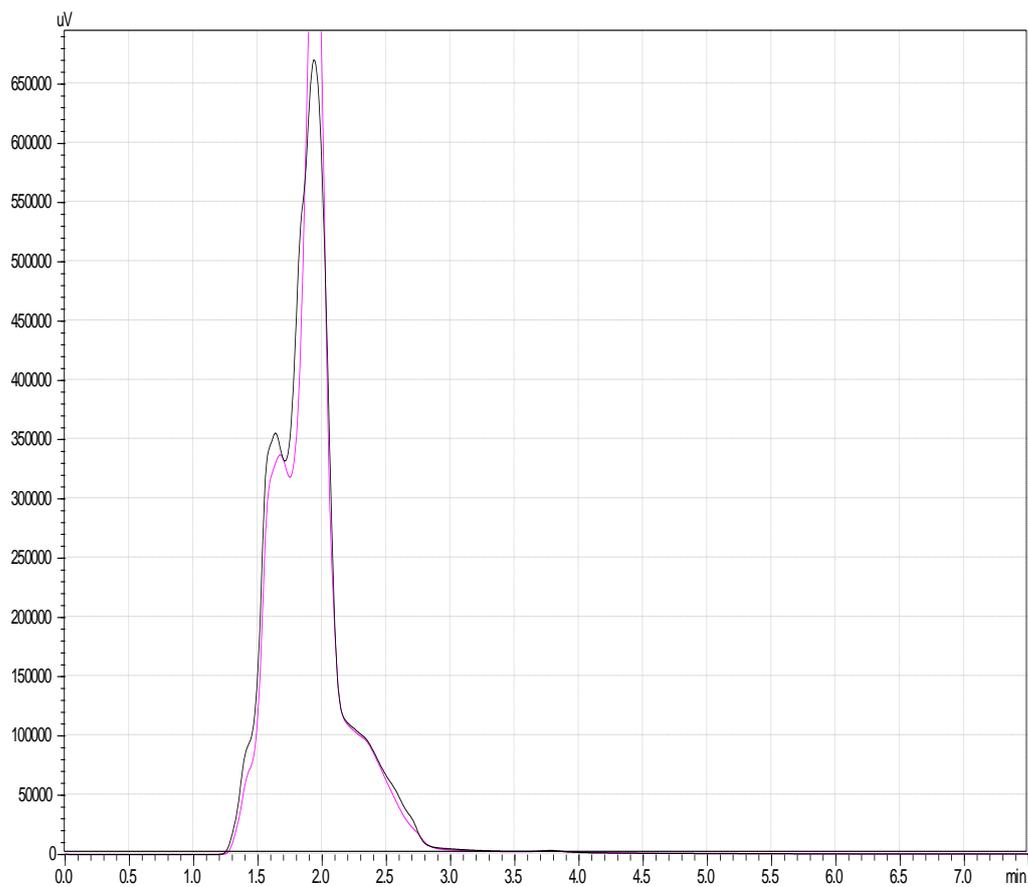


Fonte: Acervo do próprio autor.

5.7.3 Extração por Precipitação Usando um Ácido Forte (Ácido Tricloroacético) como Agente precipitante

Tanto o plasma branco contaminado depois da extração como a amostra CQM não conseguiram ser extraídas quando se utiliza como agente precipitante o ácido tricloroacético (ATA), como pode ser observado na figura 5.22:

FIGURA 5.23: Cromatograma da extração pelo método da precipitação protéica por ácido tricloroacético. A linha preta indica o plasma branco contaminado depois da extração, e a linha rosa a amostra CQM (5000ng/mL) extraída.

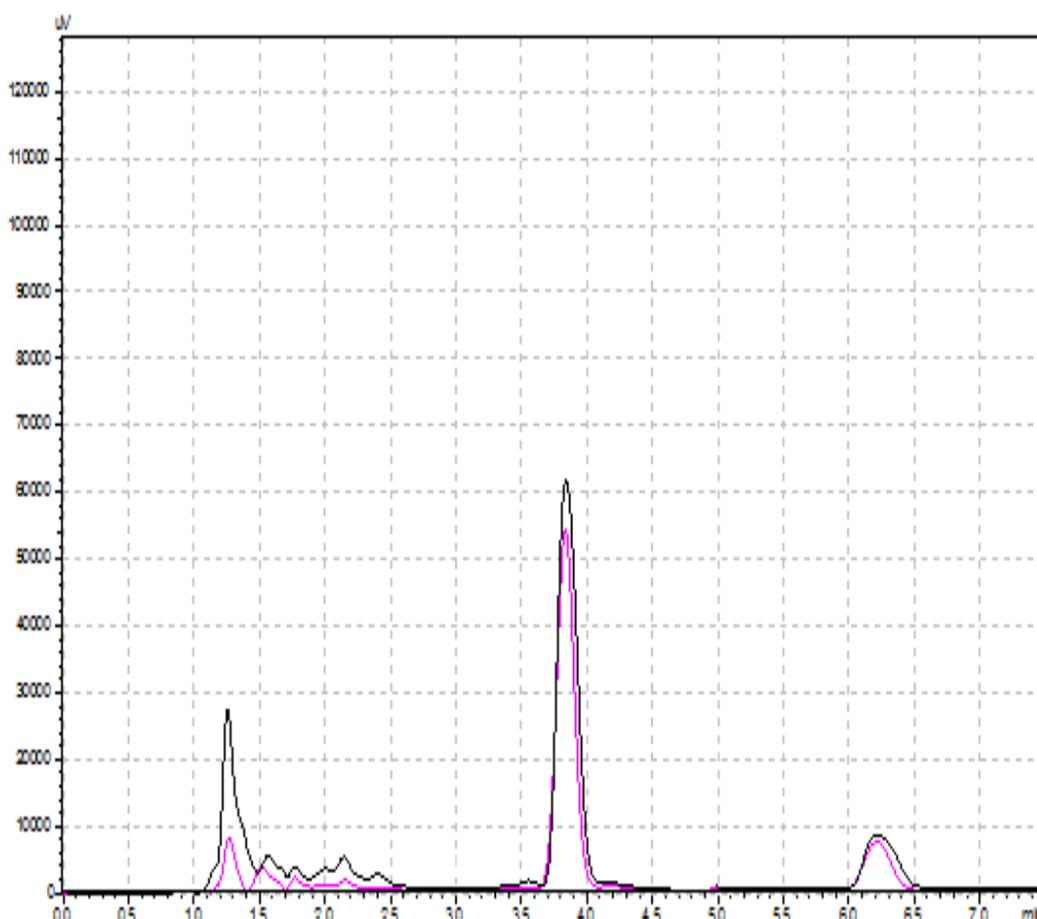


Fonte: Acervo do próprio autor.

5.7.4 Extração Líquido-Líquido

O resultado da extração das amostras CQB, CQM e CQA comparada com a extração do plasma branco contaminado após a extração foi: **83,56%** para o LPSF/AC-23 e **79,07%** para o PI. O cromatograma da extração é mostrado na figura 5.23:

FIGURA 5.24: Cromatograma da extração pelo método da extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente orgânico. A linha preta indica o plasma branco contaminado depois da extração, e a linha rosa a amostra CQM (5000ng/mL) extraída.



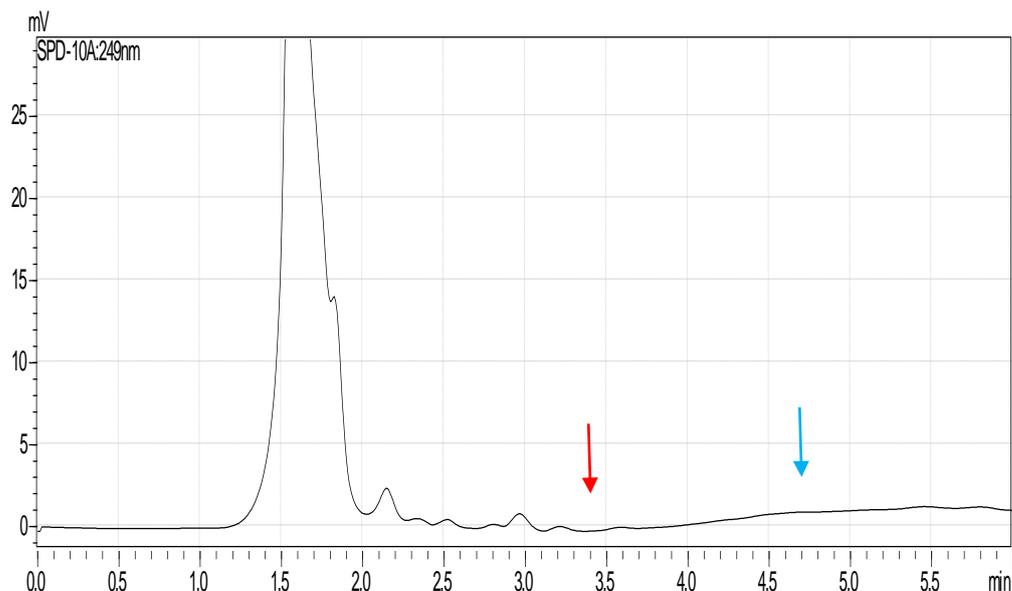
Fonte: Acervo do próprio autor.

Diante dos resultados acima mostrados, o melhor método de extração foi a Extração por Precipitação Protéica utilizando a ACN como agente precipitante, por ser o método que apresentou maior taxa de recuperação. Este foi, então, o método de extração escolhido para o decorrer deste estudo.

5.8 Verificação da Seletividade do Método

Os resultados são mostrados nas figuras 5.25, 5.26 e 5.27 abaixo:

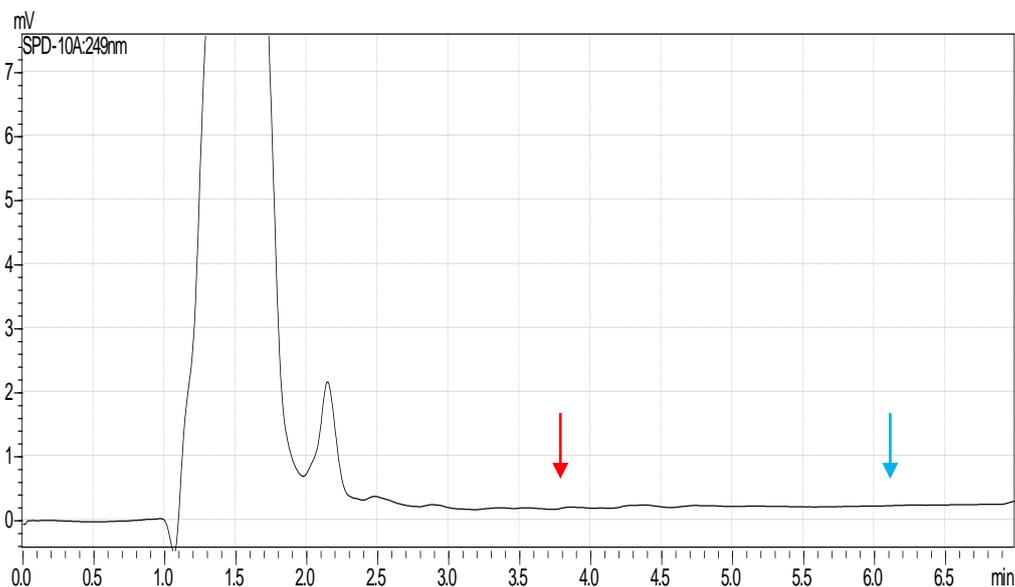
FIGURA 5.25: Cromatograma do plasma não contaminado extraído utilizando como FM Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (20:70:10), com fluxo de 1mL/min, temperatura de 40°C e pH 6,0. A seta vermelha indica a janela de tempo de eluição do LPSF/AC-23 (3,39 minutos) e a azul a do PI (4,69 minutos).



Fonte: Acervo do próprio autor.

Com a FM constituída por Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (20:70:10), percebe-se que os componentes plasmáticos eluem na janela de tempo entre 1 e 3,5 minutos e não conseguiu-se uma estabilização adequada da linha de base. Como o LPSF/AC-23, para essas condições cromatográficas, tem um tempo de eluição de 3,39 minutos, os componentes plasmáticos poderiam interferir no resultado do método, causando uma perda de seletividade. Por essa razão, esta FM não foi escolhida.

FIGURA 5.26: Cromatograma do plasma não contaminado extraído utilizando FM Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (55:30:15), com fluxo de 1mL/min, temperatura de 40°C e pH 6,0. A seta vermelha indica a janela de tempo de eluição do LPSF/AC-23 (3,87 minutos) e a azul a do PI (6,18 minutos).

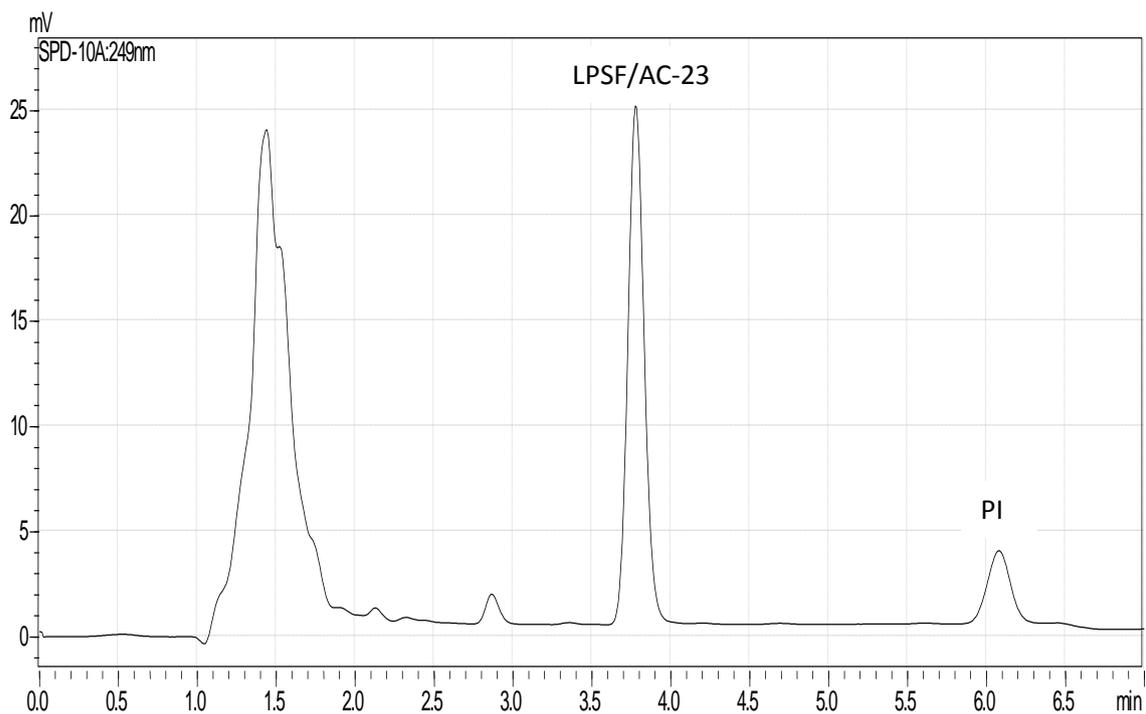


Fonte: Acervo do próprio autor

Com esta FM percebe-se que todos os componentes plasmáticos eluem na janela de tempo entre 1 e 3,0 minutos, não interferindo assim com a janela de tempo de eluição do LPSF/AC-23. Além disso, conseguiu-se uma estabilização adequada da linha de base. Por estas razões, esta FM, juntamente com os outros parâmetros de pH, temperatura e fluxo, foi escolhida como a ideal para o decorrer deste estudo .

Desta maneira, o tempo de retenção do LPSF/AC-23 ficou definido em $3,80 \pm 0,02$ minutos e o tempo de retenção do PI em $6,15 \pm 0,05$ minutos. A figura 5.26 ilustra um cromatograma obtido depois do delineamento de todos os parâmetros cromatográficos e método de extração:

FIGURA 5.27: Cromatograma da amostra CQM (5000 ng/mL) obtido depois da definição de todos os parâmetros cromatográficos e do método de extração:



Fonte: Acervo do próprio autor

5.9 Determinação do Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior

Segundo os parâmetros determinados pela ANVISA, o LD foi de 40 ng/mL e o LIQ foi de 100 ng/mL.

5.10 Verificação da Linearidade no Método

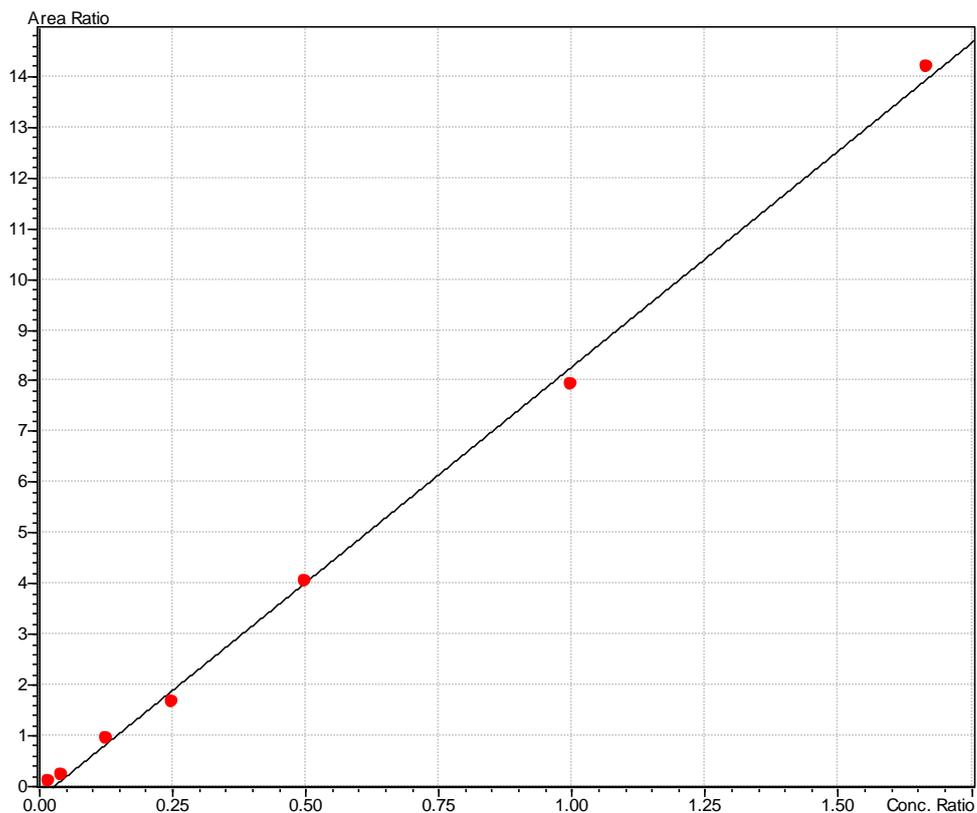
Os resultados dos testes de linearidade são mostrados nas tabelas 5.4 e 5.5 e na figura 5.28 abaixo:

TABELA 5.4 : Precisão e Exatidão da Curva Padrão

Concentração Nominal do LPSF/AC-23 (ng/mL)	Intra-dia			Inter-dias		
	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R. (%) (n=6)	ER (%)	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R (%) (n=6)	ER (%)
100	99.17 ± 2.97	2.99	-0.83	97.91 ± 3.13	3.19	-2.09
250	249.19 ± 14.86	5.96	-0,32	251.13 ± 2.05	0.81	0.45
750	746,49 ± 11.08	1.48	-0.47	760.10 ± 23.58	3.10	1.34
1500	1456.69 ± 38.11	2.61	-2,88	1461.74 ± 34.84	2.38	-2.55
3000	3008.69 ± 126.59	4.20	0,28	3039.29± 192.64	6.33	1.30
6000	6091.48 ± 201.60	3,30	1.52	5966.63 ± 156.38	2.62	-0,55
10000	9750.31 ± 311.42	3,19	-2.49	10052.28 ± 279.60	2,78	0,52
Σ RE (%)			-5.19			-1.58

Fonte: Acervo do próprio autor.

FIGURA 5.28: Curva padrão obtida pela injeção de soluções extraídas de plasma contaminado nas concentrações de 100, 250, 750, 1500, 3000, 6000 E 10000 ng/mL.



Fonte: Acervo do próprio autor.

TABELA 5.5: Equação da reta, coeficiente de correlação e coeficiente de determinação da curva de calibração representada na figura 5.28.

Equação da reta	r	r ²
$Y = 8.509761X - 0.2282796$	0.9991388	0.9982784

Fonte: Acervo do próprio autor.

O coeficiente de correlação linear variou de **0,9937** a **0,9991** e o coeficiente de determinação de **0,9874** a **0,9982**, demonstrando assim que o método possui uma boa relação de linearidade.

5.11 Recuperação do Método

A recuperação média para as concentrações individuais e a recuperação média geral do LPSF/AC-23 e do PI são mostradas na tabela 5.6:

TABELA 5.6: Recuperação do LPSF/AC-23 e do Padrão Interno

	Concentração plasmática (ng/mL)	LPSF/AC-23	Padrão Interno
		Recuperação Média % (n=5)	Recuperação Média % (n=15)
CQB	300	98,63	-----
CQM	5000	92,31	-----
CQA	8000	85,81	-----
PI	6000	-----	89,67
Média Geral		92,25	89,67

Fonte: Acervo do próprio autor.

Os resultados mostram que a tanto o analito como o PI são extraídos de maneira muito satisfatória da matriz orgânica (recuperação em torno de 90% para ambos) quando se usa o método da Precipitação protéica com ACN como agente precipitante, confirmando os resultados obtidos nos testes para definição do melhor método de extração.

5.12 Precisão e Exatidão do Método

Os resultados dos testes de Precisão e Exatidão estão expressos na tabela 5.7:

TABELA 5.7: Precisão e Exatidão na Quantificação do LPSF/AC-23

Concentração Nominal LPSF/AC-23 (ng/mL)	Intra-dia (n=8)			Inter-dias (n=8)		
	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R (%)	ER (%)	Concentração recuperada (media ± D.P.) (ng/mL)	D.P.R (%)	ER (%)
100	100.51 ± 14.96	14.88	0.51	100.98 ± 16.70	16.53	0.98
300	291.97 ± 6.68	2,28	-2,67	289.51 ± 16.37	5.65	-3.49
5000	4894.01 ± 223.27	4.56	-2.11	4850.33 ± 153.45	3.16	-2.99
8000	8613.94 ± 278.57	3,23	7.67	8466.96 ± 414.40	4.89	5.83

Fonte: Acervo do próprio autor.

Os resultados mostram que o método desenvolvido é preciso e exato, pois os valores de desvio padrão relativo (DPR) e Erro Relativo (ER) ficaram abaixo de 20% para o Limite inferior de quantificação (100 ng/mL) e 15% para as concentrações Controle de Qualidade Baixa (300 ng/mL), Média (5000 ng/mL) e Alta (8000 ng/mL), obedecendo assim os parâmetros preconizados pela ANVISA.

5.13 Determinação da Estabilidade do Analito na Matriz Biológica e nas Soluções-Padrão

Os resultados para os testes de estabilidade são mostrados na tabela 5.8:

TABELA 5.8: Estabilidade do LPSF/AC-23 no plasma de ratos Wistar e nas Soluções-Padrão sob diferentes condições de estocagem

Testes de Estabilidade (n=5)	Concentração Nominal	
	CQB (300 ng/mL)	CQA (8000 ng/mL)
Congelamento e Descongelo		
Concentração inicial (recém-preparada)	289.34 ± 2.48	9011.09 ± 251.77
Concentração final (após 3° ciclo)	278.78 ± 11.18	8830.27 ± 185.90
Variação (%)	-3.64	-2,00
Curta Duração		
Concentração inicial (recém-preparada)	273.80 ± 6.09	8624.19 ± 85.88
Concentração final (após 6 horas)	270.00 ± 10.57	8549.83 ± 109.76
Variação (%)	-1.38	-0.86
Longa Duração		
Concentração inicial (1° dia)	290.16 ± 6.93	9008.30 ± 95.80
Concentração final (30° dia)	283.20 ± 6.49	8373.07 ± 187.81
Variação (%)	-2.39	-7.05
Soluções-Padrão em Acetonitrila (após 6 horas)		
Variação (%)	-9,31	-8,38

Os resultados mostram que o LPSF/AC-23 é estável no plasma de ratos Wistar sobre diversas condições de armazenagem e temperatura, pois a porcentagem de variação apresentou um valor bem pequeno.

O analito também é estável na solução padrão de ACN por um período de 6 horas, pois a variação entre a quantidade inicial e final ficou abaixo de 15%.

VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

6.1 Fase de Pré-Validação do Método: Definição das Condições Cromatográficas Ideais, Melhor Método de Extração e Estabilidade do Analito

A “Definição das Condições Cromatográficas Ideais” juntamente com a “Preparação da Amostra” são com certeza as etapas mais demoradas e trabalhosas quando se fala em validação de métodos bioanalíticos (HERNANDES-BORGES et al., 2007; ERNY & CIFUENTES, 2006; GILAR, 2001). São etapas que, se não muito bem delimitadas e estudadas, induzem a uma grande variabilidade dos dados (erros), inviabilizando por vezes a continuidade do estudo. Assim sendo, os parâmetros estudados para o delineamento das condições cromatográficas ideais serão discutidos nos próximos parágrafos.

Segundo o estudo realizado por Misl’anova & Hutta em 2001, vários tipos de FM foram testadas e, se observou experimentalmente que todas as FM foram capazes de eluir 95% das proteínas plasmáticas não extraídas em até três minutos. Baseando-se nisso, alterou-se a composição das FMs e os parâmetros experimentais de fluxo, temperatura e pH até se obter um tempo de retenção para o analito e PI que fosse o mais reduzido possível, mas que não tivesse interferência com os componentes endógenos da matriz biológica.

Os solventes utilizados para composição das FMs foram a ACN e o metanol em proporções diferentes com um tampão fosfato. Esses solventes são os de escolha quando se fala em análise de fármacos em sistemas cromatográficos (LANÇAS, 2009; BEDOR, 2007; MEYER, 2004). Neste contexto, o primeiro ponto a ser observado pelos resultados obtidos na sessão 5.6.1 deste trabalho, é que o TR do LPSF/AC-23 é diretamente proporcional a quantidade de água presente na FM, a ponto de que, se for utilizada uma FM em que a metade de sua composição seja tampão fosfato, o mesmo pode demorar mais de sessenta minutos para ser eluído (Figura 5.8). Isso evidencia que o composto realmente tem grande afinidade por fases orgânicas (apolar) e pouca afinidade por sistemas aquosos, corroborando os resultados encontrados nos testes de

solubilidade e obtenção dos descritores da molécula ($\text{LogP} = 5.51$) (CHEMAXON, 2011).

Outro ponto relevante é que, se for comparado a influência dos solventes orgânicos Metanol e ACN na força de eluição da FM, observa-se que o último influi de maneira mais acentuada este parâmetro, aumentando-a, pois quando se observa os dados obtidos entre as FMs constituídas de Metanol/Tampão fosfato (50:50 v/v) e ACN/Tampão fosfato (50:50 v/v), o LPSF/AC-23 é eluído no intervalo de 60 minutos (mais precisamente aos 39,55 min.) quando se utiliza a FM com ACN (Figura 5.9), o que não acontece quando utiliza-se a FM com Metanol (Figura 5.8). Este fato novamente vem de encontro com o resultado encontrado na sessão 5.2 deste trabalho, onde se observa que o LPSF/AC-23 tem uma maior solubilidade em ACN do que em metanol.

O fluxo do ensaio foi fixado em 1 mL/min, alterando-se então os outros parâmetros cromatográficos para se atingir um TR e simetria dos picos do analito e PI satisfatórios. Esse valor foi escolhido por se tratar de um fluxo muito utilizado em ensaios bioanalíticos envolvendo substâncias com estruturas moleculares parecidas com o LPSF/AC-23 (SUN et al., 2009; UCHOA et al., 2008; SUN et al., 2006; HRUSKA & FRYE, 2004; RADHAKRISHNA et al., 2002; TAKENAGA et al., 1995).

A temperatura, como era de se esperar, tem uma importante influência no TR do analito e PI. À medida que se aumenta a temperatura, o TR de ambos diminui (tabela 5.2). Isto é devido a uma diminuição da viscosidade da FM, fazendo com que aja assim uma menor resistência da passagem da mesma pela coluna cromatográfica. Outro fato importante com relação à análise desse parâmetro, é que somente na temperatura de 70°C foi encontrado sinais de degradação do LPSF/AC-23 (evidenciada pela diminuição da área e altura do pico do analito e presença de outro pico); nas demais temperaturas, o analito se mostrou estável às mudanças de calor. Neste contexto, a temperatura escolhida foi de 40°C. Primeiramente por proporcionar TR baixos tanto do analito quanto do PI, segundo ser uma temperatura que não sobrecarrega o funcionamento do forno e, terceiro, por se tratar de uma temperatura empregada na análise quantitativa de outros compostos de estrutura parecida em matrizes plasmáticas (TAKENAGA et al., 1995).

Analisando-se o parâmetro “pH”, conclui-se que tanto o LPSF/AC-23 quanto o PI se comportam como bases fracas, pois a medida que o valor de pH diminui, o tempo de retenção de ambos também diminui (tabela 5.3), confirmando o resultado encontrado por Silva em 2011 em relação ao PI. Isso é devido ao maior grau de ionização das duas moléculas e, conseqüentemente, a diminuição da afinidade de ambas pela FE apolar (SÝCORA et al., 2002). Mas, apesar da confirmação de que o analito e o PI têm uma natureza básica, o pH não influencia de maneira acentuada o TR das duas substâncias (tabela 5.3), pois a faixa de pH estudada (8.0 a 5.0) passou pelo pKa do LPSF/AC-23. Se fossem observadas grandes alterações nos TR, principalmente em valores próximos ao pKa, poder-se-ia afirmar que a molécula sofre uma grande influência desse parâmetro, fato que não ocorreu (SÝCORA et al., 2002).

Com relação à “Definição do Melhor Método de extração”, analisando os resultados percebe-se que os dois métodos empregados (Precipitação Protéica e Extração Líquido-Líquido) podem ser empregados por demonstrarem uma excelente porcentagem de recuperação do analito, mas no primeiro deve-se atentar para a escolha do agente precipitante.

Se for utilizado acetonitrila para tal função, os resultados são muito satisfatórios (86% de recuperação do LPSF/AC-23 e PI), confirmando os dados encontrados em trabalhos anteriores para essa classe de molécula (tiazolidina e/ou tiazacridina) onde as porcentagens de recuperação do analito variaram de 78,5 à 113,8 (UCHOA et al., 2010; HE et al., 2007; SUN et al., 2006; XU et al., 2005; HRUSKA & FRYE, 2004; JAYEWARDENE et al., 1997).

Quando se utiliza metanol como agente precipitante os resultados também são satisfatórios, embora ligeiramente inferior à recuperação obtida quando se usa ACN como agente precipitante (74,80% de recuperação do LPSF/AC-23 e 81,68% de recuperação do PI). Quando se compara este resultado ao de outros trabalhos que utilizaram metanol como agente precipitante percebe-se que os dados são praticamente iguais aos obtidos por Uchoa e colaboradores em 2008 (recuperação do analito de 74%), e é superior do valor obtido por Silva em 2011 (recuperação de 66,63%).

Já quando se utiliza um ácido forte (ácido tricloroacético) como agente precipitante, tanto o LPSF/AC-23 quanto PI não são extraídos nem na amostra e nem no padrão. Analisando os resultados, pode-se supor que o ácido deve ter degradado o

LPSF-AC23 e o PI, pois nem nos padrões contaminados depois da extração foram encontrados vestígios das duas substâncias. Isso vem de acordo com que afirma Gilar et al (2001) em seu estudo de revisão sobre as etapas de preparação de amostras. O autor afirma que a utilização de ácidos fortes como agentes precipitantes pode levar a uma incompatibilidade com vários tipos de analitos, principalmente aqueles que se comportam como bases fracas ou que são influenciados por mudanças de pH. Outro dado contrário à escolha desde método é a grande quantidade de substâncias plasmáticas extraídas (como se pode observar na Fig. 5.22). Idealmente, os melhores resultados quando se analisa a eficácia de um método de extração é o êxito na extração da maior quantidade do analito e a não extração, ou a menor extração possível dos componentes endógenos da matriz biológica. Neste contexto, para análise do LPSF-AC23 o método de extração por precipitação protéica usando ácido tricloroacético como agente precipitante não deve ser empregado.

A Extração Líquido-Líquido é outro método que apresentou uma recuperação muito boa (83,56% para o LPSF/AC-23 e 79,07% para o PI) e também pode ser utilizado. Esse resultado é muito parecido com o encontrado por Sun et al em 2009 (recuperação média de 85,53%) e bem superior ao encontrado por Kolte et al em 2003 (recuperação de 60%). Neste trabalho o método da ELL não foi utilizada por empregar um maior número de etapas na preparação das amostras (evaporação das amostras sob nitrogênio e posterior ressuspensão das mesmas) demandando assim mais tempo para a realização da análise.

Nesse estudo não foi realizado testes de Extração em Fase Sólida, por ser um método com um custo mais elevado. Então, para que se possa saber qual é o melhor método de extração para esta molécula (LPSF/AC-23) e se tenha resultados definitivos, é sugerido que, em outra oportunidade, seja feito os testes de EFS e seu resultado seja comparado aos encontrados neste trabalho.

Ainda com relação aos testes de extração, através da análise do resultado de plasmas extraídos não contaminados com o analito, pode-se definir qual a FM seria realmente empregada. Com a FM constituída por Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (20:70:10), percebe-se que os componentes plasmáticos eluem na janela de tempo entre 1 e 3,5 minutos e não conseguiu-se uma estabilização adequada da linha de base (figura 5.24). Como o LPSF/AC-23, para essas condições cromatográficas, elue em

3,39 minutos, os componentes plasmáticos poderiam interferir no resultado do método, causando uma perda de seletividade. Já com a FM constituída por Acetonitrila/Metanol/Tampão fosfato 5 mM (55:30:15), percebe-se que todos os componentes plasmáticos eluem na janela de tempo entre 1,0 e 3,0 minutos, não interferindo assim com a janela de tempo de eluição do LPSF/AC-23 que nestas condições cromatográficas elue em 3,87 minutos. Além disso, conseguiu-se uma estabilização adequada da linha de base. Por estas razões, esta FM, juntamente com os outros parâmetros de pH, temperatura e fluxo, foi escolhida como a ideal para o decorrer deste estudo. Deste modo, através do delineamento dos parâmetros cromatográficos como composição da fase móvel, pH, temperatura e fluxo, conseguiu-se que os picos gerados pelo LPSF/AC-23 e padrão interno fossem simétricos e isentos de interferências, com todos os constituintes endógenos detectáveis da matriz biológica eluindo antes de 3,5 minutos, não interferindo, assim, na quantificação do composto pesquisado e mostrando que o método desenvolvido apresenta boa seletividade.

Com relação à estabilidade do LPSF/AC-23 na matriz biológica utilizada neste estudo, os resultados demonstraram que o analito é estável em diversas condições de armazenagem e temperatura, pois variações sempre menores que 15% em relação a concentração inicial foram encontradas para os testes de “Congelamento e Descongelamento” (variação máxima de -3,34%), “Curta Duração” (variação máxima de 1,38%) e “Longa Duração” (variação máxima de 5,11%).

Já com relação à estabilidade do LPSF/AC-23 nas soluções-padrão em ACN, os resultados também comprovam a estabilidade do mesmo nestas soluções, pois, a variação máxima em relação à concentração inicial foi de -9,31%, novamente, abaixo de 15%, como preconiza a ANVISA.

Baseando-se nisto, pode-se concluir que tanto o LPSF/AC-23, quanto o padrão interno utilizado neste estudo mantiveram suas características durante todo o período estudado, demonstrando, portanto, baixo teor de degradação nas condições de análises em que foram realizados os experimentos.

É necessário enfatizar que os resultados aqui obtidos dizem respeito à estabilidade do analito somente nas condições estudadas e somente na matriz biológica estudada, no caso, o plasma de rato da espécie Wistar, não podendo os mesmos serem extrapolados para outras matrizes biológicas e condições de temperatura e armazenamento diferentes das estudadas na sessão 5.13.

6.2 Fase de Validação do Método: Verificação da Linearidade, Recuperação, Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos na sessão 5.10 deste trabalho mostraram que o coeficiente de correlação linear e o coeficiente de determinação das curvas de calibração variaram de **0,9937** a **0,9985** e de **0,9874** a **0,9971**, respectivamente. Ambos acima do limite de **0,98** determinado pela ANVISA, demonstrando assim que o método é linear na faixa de concentração de 100 ng/mL a 10.000 ng/mL.

O método desenvolvido obteve uma excelente recuperação tanto do LPSF/AC-23 quanto do PI. O primeiro teve uma recuperação média de **92,25%** e o segundo **89,67%**, resultados até um pouco superiores aos encontrados nos testes de pré-validação quando se foi definido o melhor método de extração, mostrando que a metodologia desenvolvida realmente consegue recuperar quase todo o analito e PI que foi usado para contaminar a amostra, fato muito relevante para os ensaios posteriores de farmacocinética *in vivo*.

Ao se analisar os resultados da sessão 5.12, observa-se que o método desenvolvido é preciso e exato dentro da faixa de concentração da curva de calibração (100 – 10.000 ng/mL), pois os valores do Desvio Padrão Relativo e Erro Relativo ficaram sempre abaixo de 20% para a amostra Controle de Qualidade na concentração do LIQ e inferior a 15% para as concentrações CQB, CQM e CQA, atingindo assim o é preconizado pela ANVISA.

O método também demonstrou uma boa reprodutibilidade dos resultados em todas as análises realizadas, se mostrando, portanto, um método robusto frente às possíveis interferências que possam existir de um dia para o outro.

6.3 Aspectos Gerais do Método

Por se tratar de uma molécula inédita, não há como comparar diretamente os aspectos e parâmetros deste método com os de outros métodos já validados, mas, pode-se comparar os resultados obtidos com trabalhos que utilizaram moléculas semelhantes ao LPSF/AC-23, como tiazacridinas e tiazolidinadionas. Seguindo este raciocínio, Jayewardene e colaboradores em 1997 desenvolveram e validaram um método para a

determinação de uma pirazoloacridina com atividade antitumoral em plasma humano. O TR obtido por eles foi de $13,7 \pm 0,5$ minutos para o analito. Quando se compara o TR do LPSF/AC-23 ($3,80 \pm 0,02$ minutos) e do PI ($6,15 \pm 0,05$ minutos) no método aqui desenvolvido e validado percebe-se que neste trabalho o método desenvolvido é praticamente duas vezes mais rápido.

Se for comparado o tempo de análise total do método aqui desenvolvido (menos de 7 minutos) com o de outros trabalhos para a quantificação de tiozolidinadionas em plasma de ratos ou humanos, novamente o primeiro leva vantagem, a saber: 25 minutos (KOLTE et al., 2003), 12 minutos (SUN et al., 2009), 11 minutos (SUN et al., 2006), 9 minutos (SRIPALAKIT et al., 2006), 8 minutos (HE et al., 2007) e 7,5 minutos (UCHOA et al., 2008). Isso em análise cromatográfica significa economia de tempo (possibilitando assim que análises em bateladas (*high-throughput*) possam ser feitas), economia de material e também menor tempo de exposição do analito aos processos de degradação.

Outro aspecto importante é que o método desenvolvido neste trabalho utiliza um pequeno volume de plasma para a realização das análises (100 μ L), fato bastante relevante já que, nos estudos de farmacocinética envolvendo pequenos roedores, pouca quantidade de amostra da matriz biológica (plasma) é geralmente obtida dificultando assim a realização das análises. Se comparado com o volume de plasma utilizado em outros trabalhos envolvendo moléculas semelhantes, a quantidade de amostra aqui utilizada é dez vezes menor (SRIPALAKIT et al., 2006; KOLTE et al., 2003), duas vezes e meio menor (JAYEWARDENE et al., 1997) e duas vezes menor (HE et al., 2007), mostrando novamente ser um método bem vantajoso e permitindo assim que um número grande de análises possam ser feitas com uma pequena quantidade de material biológico.

Considerando o potencial terapêutico desta molécula, o método aqui desenvolvido e validado, por autorizar uma determinação direta do LPSF/AC-23 no plasma, poderá ser usado no futuro para a realização dos estudos de farmacocinética *in vivo* em modelos animais, fato que se faz necessário para a obtenção de parâmetros farmacocinéticos importantes como velocidade de absorção, efeito de primeira passagem hepática, concentração plasmática máxima, tempo de meia vida de eliminação, etc, que possam prever o comportamento entre este composto bioativo e o organismo humano.

Finalmente, espera-se que este estudo, por ser parte das etapas envolvidas na cadeia produtiva de fármacos e outros insumos estratégicos para a saúde, possa contribuir para a aquisição, no futuro, da patente de um novo agente antitumoral, angariando recursos financeiros para esta instituição de ensino e ajudando a diminuir o sofrimento de milhares de pessoas.

REFERÊNCIAS

ANSEL, HC; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª Ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2007.

AQUINO-NETO, F. R; NUNES, D.S.S.; **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 2003.

ARIMONDO, P. B.; HÉLÈNE, C. Design of new anti-cancer agents based on topoisomerase poisons targeted to specific DNA sequences. **Curr Med Chem Anticancer Agents**, v. 1, p. 219-235, 2001.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C .A. M.. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação de Fármacos**. Editora ARTMED. Porto Alegre, 2001.

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

BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 948-954, 2007.

BONSE, S., SANTELLI-ROUVIER, C., BARBE, J., KRAUTH-SIEGEL, RL.. Inhibition of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 5448-5454, 1999.

BONDE, C. G.; GAIKWAD, N. J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2151-2161, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003

_____. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional do Câncer (INCA)**. Disponível em: < <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>. Acesso em: 06 jan. 2011.

CHAMDRAPPA, S. B.; BENAKA-PRASAD, S. B.; VINAYA, K.; ANANDA-KUMAR, C. S.; THIMMEGOWDA, N. R.; RANGAPPA, K. S. Synthesis and in vitro antiproliferative activity against human cancer cell lines of novel 5-(4-methylbenzylidene)-thiazolidine-2,4-diones. **Invest. New Drugs**, v. 26, p. 437-444, 2008.

CHEMAXON. **Chemicalize.org**. Disponível em: < <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=structureId%3A374216720122&source=fp>>. Acesso em 15 jun 2011.

COSTA-COUTO, M. H.; NASCIMENTO, A. C.; Assimetria nas relações internacionais, propriedade industrial e medicamentos anti-aids. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 1869 – 1877, 2008

COUFAL, P.; BOSAKOVA, Z.; TESAROVA, E.; KAFKOVA, B.; SUCHANKOVA, J.; BARBE, J. Quantification and purity determination of newly synthesized thioacridines by capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 183 – 189, 2002.

DEXTER, D. L.; BARBOSA, J. A.; CALABRESI, P. *N,N*-Dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human Colon Carcinoma Cells. **Cancer Research**, v. 39, p. 1020-1025, 1979.

DIZIEGIELEWSKI, J. et al. Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, p. 1653-1662, 2002.

ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 509 – 515, 2006.

GILAR, M. Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. **Analytical Biochemistry**, v. 298, p. 196 -206, 2001.

GIRAULT, S., GRELLIER, P., BERECIBAR, A., MAES, L., MOURAY, E., LEMIÈRE, P., DEBREU, MA., DAVIOUD-CHARVET, E., SERGHERAERT, C., Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. **J. Med Chem.**, v. 43, p. 2646-2654, 2000.

HE, J.; HU, Y. F.; DUAN, L. F.; TAN Z. R.; WANG, L. S.; WANG, D.; ZHANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; TU, J. H.; YAO, Y. M., ZHOU, H. 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.

HERNANDES-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRIGUES-DELGADO, M. A.; CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 214 -226, 2007.

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.

JARDIM, I. C. S. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Sientia Chromatographica**, v.2, n. 1, p.13-25, 2010.

JAYEWARDENE, A. L.; SANTORO, J. E.; GAMBERTOGLIO, J. G. High-performance liquid chromatography determination of pyrazoloacridine, a nitro-9-methoxyacridine anticancer agent, in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 702, p. 203-210, 1997.

KARNES, H. T.; SHIU, G.; SHAH, V. P. Review: Validation of Bioanalytical Methods. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 421-426, 1991.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. 1^a ed., Editor Wiley Interscience. New York, 2007.

KOLTE, B. L.; RAUT, B. B.; DEO, A. A.; BAGOOOL, M. A.; SHINDE, D. B. Liquid chromatography method for the determination of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 37-44, 2003.

KORFMACHER, W. A. Review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 2, p. 1357-1367, 2005.

KOROLKOVAS, A.. **Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos**, 2º ed., Editora EDART. São Paulo, 1977.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE**. 1ª Ed., Editora Átomo. Campinas, 2009.

_____. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. Editora Rima. São Carlos, 2004a.

_____. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. Editora Rima. São Carlos, 2004b.

LERMAN, L. S. Structural considerations of the interaction of DNA and acridines. **J. Mol. Biol.**, v. 3, p. 18-30, 1961.

_____. The structure of the DNA – acridine complex. **Proc Nati. Acad. Sci. USA**, v. 49, p. 94-102, 1963.

LINTELMANN, J.; FRANÇA, M. H.; HUBNER, E.; MATUSCHEK, G. A liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric method for the determination of azaarenes in atmospheric particulate matter. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 1636-1646, 2010.

MAIA, M. B. S.; MARTINS, I. L.; NASCIMENTO, D. N.; CUNHA, A. N.; LIMA, F. E. G.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, O. M.; MORAES, M. E. A. Validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the bioequivalence study of norfloxacin in plasma samples. **Ther Drug Monit.**, v. 30, n. 3, p. 341-346, 2008.

_____. Simultaneous quantitative analysis of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 304–311, 2007.

MEYER, R. V. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 4º ed., Editor John Wiley & Sons Ltda. New Jersey, 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.

O'MAILLE, G.; PAI, S. M.; TAO, X.; DOUGLAS JR, G. T.; JENKINS, R. G. An improved LC-ESI-MS-MS method for simultaneous quantification of rosiglitazone and N-desmethyl rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 934-939, 2008.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> >. Acesso em: 06 set. 2011a.

_____. **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: < <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html> >. Acesso em: 06 set. 2011b.

PIGATTO, M. C.; LIMA M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; VESSECCHI, R.; ASSIS, M. D.; SANTOS, J. S.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4245-4251, 2011.

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.

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.

RADHAKRISHNA, T.; SATYANARAYANA, J.; SATYANARAYANA, A. LC determination of rosiglitazone in bulk and pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 873-880, 2002.

SANTOS, I. B. V. **Sínteses e Atividades Antiinflamatória e Antinociceptiva de Novas Tiazolidinadionas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2009.

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.

SCHOFIELD, P. C.; ROBERTSON, I. G.; PAXTON, J. W.; McCRISTAL, M. R.; EVANS, B. D.; KESTELL, P.; BAGULEY, B. C.. Metabolism of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide in cancer patients undergoing a phase I clinical trial. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 44. p. 51-8, 1999.

SILVA, A. A. R., GÓES, A. J. S., LIMA, W. T., MAIA, M. B. S.. Antiedematogenic Activity of Two Thiazolidine Derivatives: *N*-Tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene) Rhodanine (GS26) and *N*-Tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2,4-thiazolidinedione (GS28). **Chem. Pharm. Bull.** 51(12) 1351—1355, 2003.

SILVA, R. M. **Determinação Quantitativa de um Derivado Tiazolidínico (3-(2-bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona em Plasma de Ratos: Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2011.

SILVA, T. G. **Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Derivados Acridino-tiozolidínicos e Acridino-imidazolidínicos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2003.

SOARES, L.V. **Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Editora Manole. Barueri, 2006.

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.

- SUN, N.; LIN, M.; FAN, Y.; 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.
- SUN, N.; LU, G.; LIN, M.; FAN, G.; WU, Y. 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, X.; LI, X.; CAI, S.; QIN, F.; LU, X.; LI, F. High performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 323-328, 2007.
- SUZUKI, Y.; AKIMA, M.; TAMURA, K. Effects of CP-060S, a Novel Cardioprotective Drug, on Cardiac Function and Myocardial Oxygen Consumption. **General Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 57-63, 1999.
- SÝCORA, D.; TESAROVÁ, E.; ARMSTRONG, D.W. Practical considerations of the influence of organic modifiers on the ionization of analytes and buffers in reversed-phase LC. **LCGC North América**, v. 20, n. 10, p. 975-981, 2002.
- TAKENAGA, N.; ISHII, Y.; MONDEN, S.; SASAKI, Y.; HATA, S. Simultaneous determination of a new anticancer agent (NB-506) and its active metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 674, p. 111-117, 1995.
- UCHOA, F. D.; PALMA, E. C.; LIMA, M. C.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; COSTA, T. D. Development and validation of an HPLC-MS method for determining the thiazolidinone PG15 in rat plasma. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 4, p. 1215-1221, 2010.
- UCHOA, F. D.; CATTANI V. B.; LIMA, M. C.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; COSTA, T. D. Development and application of LC-UV method for the quantification of the anti-inflammatory thiazolidinone PG15 in rat plasma. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1553-1559, 2008.

VERMA A.; SARAF S. K.. 4-Thiazolidinone e A biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 43, p.: 897- 905, 2008.

XU, X.; ZHOU, Q.; KORFMACHER, A. Development of a low volume plasma sample precipitation procedure for liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays used for drug discovery applications. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2131-2136, 2005.

ANEXO**Anexo A: Folha de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)**

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 243/10

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. 024804/2009-62

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 (5-ACRIDIN-9-ILMETILENO-3-(4-FLUOR-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL 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,

Maria Teresa Jansen

 Profa. Maria Teresa Jansen
 Presidente do CEEA