

CAPÍTULO III

***DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
QUIRAL DE LC-UV PARA A QUANTIFICAÇÃO DO
ACETATO DE ESLICARBAZEPINA E DOS SEUS
METABOLITOS EM PLASMA HUMANO***

1. INTRODUÇÃO

O trabalho cuja apresentação agora aqui se inicia marca o início da concretização dos objectivos propostos aquando da concepção inicial desta dissertação.

Atendendo ao perfil populacional de incidência da epilepsia, caracterizado pela ocorrência de dois picos nos extremos da idade, à variabilidade farmacocinética interindividual intrínseca aos vários grupos etários e à necessidade de quantificação das concentrações plasmáticas dos fármacos antiepilépticos ou dos seus metabolitos activos sempre que se pretendam estabelecer regimes posológicos individualizados ou avaliar a adesão do doente à terapêutica (LOWENSTEIN, 2004; PERUCCA, 2006b), considerou-se ser pertinente o desenvolvimento de um método de LC, simples e prático, para quantificar o ESL e os seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano.

Ao iniciar este trabalho, no final de 2004, o ESL encontrava-se em fase de ensaios clínicos e, obviamente, já outros métodos de LC tinham sido desenvolvidos para suportar as etapas de síntese e os estudos pré-clínicos e clínicos. Porém, o único método quiral conhecido para a determinação do ESL e dos seus metabolitos usava como sistema de detecção a espectrometria de massa (MS – *mass spectrometry*) (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001). Conscientes de que muitos laboratórios e hospitais não estão equipados com este tipo de detector, pelo custo elevado do equipamento (VELPANDIAN *et al.*, 2004; JANCHAWEE *et al.*, 2007), juntaram-se esforços para desenvolver e validar o primeiro método quiral de LC-UV para a determinação quantitativa do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano (ALVES *et al.*, 2007a). A disponibilidade de uma técnica deste tipo poderá constituir uma ferramenta útil, não apenas para a investigação clínica, mas também para a monitorização farmacoterapêutica após a introdução do ESL na prática clínica.

1.1 – Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico Cromatográfico

Nos últimos anos, a interdependência crescente entre os países fez emergir a necessidade da aceitação internacional dos resultados provenientes dos métodos analíticos e, conseqüentemente, para garantir um nível comum mínimo de qualidade, o uso de métodos analíticos validados é cada vez mais uma condição indispensável. Os resultados gerados por métodos não validados são desprovidos de qualquer significado e não são reconhecidos pelas autoridades oficiais (HARTMANN *et al.*, 1998).

De facto, os métodos analíticos para a quantificação de fármacos e metabolitos em amostras biológicas, pela qualidade dos dados que fornecem, desempenham um papel determinante na avaliação e interpretação dos resultados decorrentes de ensaios pré-clínicos, clínicos e biofarmacêuticos (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Neste sentido, o papel das ciências bioanalíticas é extremamente importante nos programas de desenvolvimento de novos fármacos ou formulações, e mesmo na implementação da terapêutica. Dados analíticos incorrectos ou pouco fiáveis podem conduzir a prejuízos económicos consideráveis, adiar o registo de novos medicamentos e até ser a causa de um diagnóstico ou tratamento errado (BUICK *et al.*, 1990; CHANDRAN e SINGH, 2007). Para contrariar estas ocorrências indesejáveis e para obter resultados fidedignos que possam ser satisfatoriamente interpretados, a aplicação de uma técnica analítica totalmente validada e bem caracterizada é essencial (SHAH *et al.*, 2000).

Desde o início da década de 90, altura em que foi realizada a primeira conferência acerca da validação de métodos analíticos “*Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*”, que se tem vindo a discutir que parâmetros de fiabilidade e que critérios de aceitação devem ser estabelecidos para validar um método a aplicar em estudos de biodisponibilidade, de bioequivalência e farmacocinéticos, no homem e em animais (SHAH *et al.*, 1992; SHAH *et al.*, 2000).

A validação de um método analítico é o processo sistemático que pretende demonstrar que a metodologia usada é aceitável para a aplicação requerida (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; CHANDRAN e SINGH, 2007).

O sucesso do processo de validação implica a existência prévia de um método analítico desenvolvido adequadamente (DADGAR *et al.*, 1995). De facto, não é possível

demarcar o processo de validação de um método analítico das respectivas condições de desenvolvimento, pois são os estudos de validação que determinam se o estado de desenvolvimento do método é satisfatório ou se são requeridas alterações ao procedimento analítico e posterior revalidação (GREEN, 1996; CHANDRAN e SINGH, 2007).

O desenvolvimento de um novo método analítico será então a fase mais crítica de todo o processo e, dependendo dos objectivos pretendidos e da experiência do investigador, poderá ser conduzido de múltiplas formas. Ao considerar as duas situações extremas, o desenvolvimento poderá envolver apenas a adaptação de um método já existente, com alterações *minor* apropriadas à nova aplicação, ou poderá implicar ideias e metodologias inovadoras requerendo um trabalho mais árduo e, muitas vezes, é incerto se o grau de desenvolvimento exigido será alcançado (EURACHEM GUIDE, 1998).

Ainda que muitos dos princípios, procedimentos e requisitos referentes à validação de métodos bioanalíticos sejam comuns a todos os tipos de metodologias analíticas, as exigências inerentes aos processos de desenvolvimento e validação dependem do tipo e da natureza do método (SHAH *et al.*, 2000; CHANDRAN e SINGH, 2007). Também é aceite que os métodos bioanalíticos usados durante os programas de desenvolvimento de novos fármacos são sujeitos a modificações constantes para suportar estudos específicos, sendo requeridos níveis diferentes de validação para demonstrar continuamente a validade dos ensaios (SHAH *et al.*, 2000).

As considerações aqui discutidas terão como alvo o desenvolvimento e a validação de técnicas cromatográficas, particularmente a determinação quantitativa por LC de fármacos e/ou metabolitos em amostras biológicas. No processo de desenvolvimento e validação destes métodos bioanalíticos devem ser consideradas múltiplas variáveis, desde logo atender à matriz biológica usada (que deverá ser aquela das amostras pretendidas), ao procedimento de colheita da amostra e ao tempo que medeia até à análise, à separação cromatográfica dos analitos, ao sistema de detecção e ao tratamento dos dados (BRESSOLLE, BROMET-PETIT e AUDRAN, 1996; SHAH *et al.*, 2000). Geralmente, um método analítico bem desenvolvido será fácil de validar, ou seja, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação que asseguram a aceitabilidade do método serão certamente cumpridos (CHANDRAN e SINGH, 2007).

No processo de validação de métodos bioanalíticos, para fins quantitativos, devem ser avaliados pelo menos os seguintes parâmetros de fiabilidade: selectividade,

curva de calibração, limites de quantificação e de detecção, precisão e exactidão, influência da diluição da amostra, recuperação e estabilidade dos analitos na matriz biológica (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; PETERS e MAURER, 2002). De seguida, discutir-se-á sucintamente cada um destes parâmetros de validação.

1.1.1 – Selectividade

A selectividade de um método bioanalítico é a capacidade do método para diferenciar e quantificar de forma inequívoca o(s) analito(s) na presença de outros componentes da amostra, os quais podem compreender substâncias endógenas da própria matriz biológica, metabolitos, produtos de degradação, impurezas e fármacos administrados concomitantemente (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Muitas vezes, os termos *selectividade* e *especificidade* são usados de forma aleatória na literatura referente à validação de métodos cromatográficos. Porém, como a maioria dos métodos cromatográficos produz respostas não só para o analito alvo mas também para outras substâncias, o uso do termo selectividade é mais apropriado neste contexto (DADGAR e BURNETT, 1995; VESSMAN, *et al.*, 2001). Com o estudo da selectividade pretende-se demonstrar a fiabilidade das determinações na presença de interferentes, ou seja, estabelecer que o sinal obtido é atribuído apenas ao analito de interesse (EURACHEM GUIDE, 1998). De facto, num método bioanalítico em que a concentração é determinada como função da resposta, é desejável que a matriz não tenha influência nessa mesma resposta. Então, a condição para que um método bioanalítico seja considerado selectivo é a ausência de resposta na matriz biológica isenta dos analitos de interesse (denominada de matriz branca ou brancos da matriz) (KARNES, SHIU e SHAH, 1991). A selectividade do método deve ser avaliada pelo processamento de brancos da matriz com e sem a adição de analitos e respectiva injeção para testar a presença de interferentes. Os critérios estabelecidos determinam a análise de pelo menos 6 fontes independentes de brancos da matriz biológica e a selectividade deve ser assegurada no limite de quantificação (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

1.1.2 – Curva de calibração

A curva de calibração é a relação existente entre a concentração (x) do analito e a resposta cromatográfica (y) e, obviamente, tem que ser estabelecida para cada um dos analitos presentes na amostra (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta é necessário recorrer a um número suficiente de padrões ou amostras de calibração, variável de acordo com a extensão da gama de concentrações e com a natureza da relação concentração-resposta (SHAH *et al.*, 1992; SHAH *et al.*, 2000). As amostras usadas para construir a curva de calibração devem ser preparadas em brancos da matriz biológica, a qual é fortificada com concentrações conhecidas dos analitos, as quais devem abranger toda a gama de concentrações esperada. Porém, não há recomendações claras quanto ao número de níveis de concentração a estudar nem quanto ao número de replicados a analisar por nível de concentração. SHAH *et al.* (2000) referem que a curva de calibração deve ser estabelecida com um mínimo de 5 padrões de calibração, excluindo os brancos da amostra, e recorrendo ao modelo mais simples que defina adequadamente a relação concentração-resposta.

Muitas vezes, o modelo aplicado para descrever a relação entre a concentração e a resposta é a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, o qual só é aplicável na condição de homocedasticidade (variância constante em toda a gama de calibração). Todavia, a condição de homocedasticidade geralmente não é encontrada para intervalos de concentração alargados, característicos em estudos farmacocinéticos, sendo esperadas diferenças significativas nas variâncias entre o nível de concentração mais baixo e o mais elevado (heteroscedasticidade). Perante esta situação, os maiores desvios apresentados às concentrações mais elevadas tenderiam a ter maior influência na recta de regressão que os menores desvios associados às concentrações mais baixas, prejudicando a exactidão na extremidade inferior do intervalo de calibração. Assim, nos casos de heteroscedasticidade recomenda-se a aplicação da regressão linear ponderada, a qual melhora a exactidão no extremo inferior da gama de concentrações sem perturbar significativamente este parâmetro no extremo superior (KARNES, SHIU e SHAH, 1991; HARTMANN *et al.*, 1998; ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002; PETERS e MAURER, 2002).

As concentrações de analitos em amostras desconhecidas são tipicamente avaliadas recorrendo a resultados de regressão gerados a partir de curvas de calibração.

Assim, a qualidade dos dados bioanalíticos está deveras dependente da qualidade do modelo de calibração usado (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002). Portanto, ao aplicar um determinado modelo de calibração é importante avaliar a qualidade do ajuste dos dados experimentais. O coeficiente de determinação (r^2) da curva de calibração é um indicador de linearidade quando se aproxima da unidade, o qual deverá apresentar um valor de pelo menos 0,99 (CAUSEY, HILL e PHILLIPS, 1990). A qualidade do ajuste também pode ser avaliada pelos valores da percentagem do erro relativo, os quais devem aparecer aleatoriamente distribuídos numa banda horizontal estreita em torno do eixo da concentração (x) e devem apresentar a menor soma em valor absoluto (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002). A qualidade da curva de calibração é assegurada se os desvios em relação à concentração nominal não excederem 15% ou 20% no limite de quantificação (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

Por fim, após a selecção do modelo de calibração apropriado, ter-se-á de definir a gama de linearidade, ou seja, o intervalo de concentrações no qual o método bioanalítico tem capacidade de gerar resultados directamente proporcionais à concentração de analito presente na amostra, com precisão e exactidão aceitáveis (SHAH *et al.*, 2000).

1.1.3 – Limites de quantificação e de detecção

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exactidão aceitáveis (SHAH *et al.*, 2000). Têm sido usadas diferentes aproximações na determinação do LQ, porém a mais prática consiste em definir a menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada, considerando os critérios de 20% de coeficiente de variação (CV) para a precisão e $\pm 20\%$ de *bias* para a exactidão (parâmetros discutidos na *secção 1.1.4*) (PETERS e MAURER, 2002). Nos métodos cromatográficos, onde é possível quantificar o ruído da linha de base, o LQ também pode ser definido pela concentração mínima em que a razão sinal/ruído é igual ou superior 10 (PETERS e MAURER, 2002). O LQ é então a concentração mais baixa da curva de calibração e deve ser estabelecido recorrendo à análise de pelo menos 5 amostras (SHAH *et al.*, 2000). A determinação quantitativa abaixo do LQ não é

aceitável, de tal forma que para concentrações inferiores, um método apenas poderá produzir dados semi-quantitativos ou qualitativos.

O limite de detecção (LD) é a concentração mais baixa de um analito que o procedimento bioanalítico permite diferenciar do ruído de base (SHAH *et al.*, 2000). Trata-se, portanto, da concentração mais baixa de analito que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exacto. A aproximação mais comum para estimar o LD consiste em avaliar a concentração do analito que proporciona uma razão sinal/ruído igual ou superior a 3 (PETERS e MAURER, 2002).

1.1.4 – Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão de um método bioanalítico, na determinação de concentrações conhecidas do(s) analito(s) na matriz biológica, têm que ser demonstradas durante o processo de validação (SHAH *et al.*, 2000). De facto, a precisão e a exactidão determinam conjuntamente o erro dos resultados analíticos e são o critério primário ao avaliar a capacidade de um método (BRESSOLLE, BROMET-PETIT e AUDRAN, 1996).

A precisão descreve o grau de concordância entre as determinações individuais de um analito quando um procedimento é aplicado repetidamente a alíquotas de uma amostra homogénea (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Este parâmetro pode ser considerado em três categorias: repetibilidade (precisão intradia), precisão intermédia (precisão interdia) e reprodutibilidade (precisão entre laboratórios) (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; PETERS e MAURER, 2002). A precisão reflecte a distribuição dos resultados analíticos em redor do valor médio correspondente e é avaliada pela percentagem do CV [$CV (\%) = (\text{desvio padrão}/\text{média}) \cdot 100$] (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

A exactidão descreve o grau de proximidade entre os resultados médios proporcionados por um método analítico e o valor verdadeiro do analito presente na amostra. Este parâmetro pode ser estudado pela análise de amostras com concentrações conhecidas e comparação da concentração média das determinações efectuadas com a concentração teórica ou nominal (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). A exactidão é vulgarmente avaliada intra e interdia e é expressa pela percentagem do *bias*, desvio em

relação ao valor de referência $\{bias (\%) = [(C_{média} - C_{nominal}) / C_{nominal}] \cdot 100\}$ (BUICK *et al.*, 1990; WIELING *et al.*, 1996).

A precisão e a exactidão podem ser estimadas a partir dos dados analíticos resultantes da análise em replicado de amostras de concentrações conhecidas – amostras de controlo de qualidade (CQ). Para aplicações bioanalíticas é recomendado que a precisão e a exactidão sejam estudadas em, pelo menos, 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) representativas da gama de concentrações esperada, recorrendo a um mínimo de 5 determinações por nível de concentração. A precisão não deve exceder 15% de CV, ou 20% no LQ. Relativamente à exactidão, o valor médio deve estar compreendido em $\pm 15\%$ do valor nominal, ou $\pm 20\%$ no LQ (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

1.1.5 – Influência da diluição

As amostras a analisar podem, por vezes, apresentar concentrações de analitos acima do limite superior da gama de calibração. Atendendo a que a extrapolação para além dos extremos da curva de calibração não é recomendada, as amostras com concentrações superiores devem diluídas em brancos da respectiva matriz biológica e reanalisadas. Para que este procedimento possa ser aplicado, o efeito da diluição da amostra, na precisão e exactidão dos resultados analíticos, deve ser investigado durante o processo de validação do método (DADGAR *et al.*, 1995; SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

1.1.6 – Recuperação

A recuperação de um analito é um indicador da eficiência de extracção do processo analítico, a qual é referida como a percentagem da resposta do analito após a extracção da matriz biológica comparativamente àquela obtida a partir de uma solução (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

As amostras biológicas, pela sua composição intrínseca, muitas vezes não podem ser analisadas directamente, devendo ser previamente submetidas a processos de preparação mais ou menos complexos, para eliminar possíveis substâncias interferentes

e extrair os analitos em condições adequadas à análise instrumental (SORIANO *et al.*, 2001). Todas estas etapas de pré-tratamento das amostras conduzem, inevitavelmente, a perdas nos analitos, sendo importante estimar a capacidade de recuperação destes a partir da matriz biológica. Na metodologia bioanalítica, especialmente em procedimentos cromatográficos, é muito comum a adição de um padrão interno (Pi) às amostras antes da respectiva preparação. O recurso ao Pi tem por objectivo compensar as perdas que ocorrem durante o processo de extração e análise cromatográfica, ou seja, uma variação na resposta do Pi reflectir-se-á de forma similar na resposta do analito porque ambos são processados em conjunto (KARNES, SHIU e SHAH, 1991; HOOPER, 1995). Isto implica que as características físico-químicas do Pi e dos analitos sejam similares. Nestes casos, a resposta cromatográfica é então dada pela razão sinal do analito/sinal do Pi (KARNES, SHIU e SHAH, 1991).

A elevada recuperação de um analito a partir da matriz biológica é desejável. Todavia, por vezes é necessário reduzir intencionalmente a percentagem de recuperação para obter uma melhor selectividade (DADGAR *et al.*, 1995). A recuperação não necessita de ser 100%, mas a extensão em que ocorre, quer para o analito quer para o Pi, deve ser consistente, precisa e reprodutível (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001) De facto, valores de recuperação de 50, 80 e 90% foram considerados aceitáveis (BRESSOLLE, BROMET-PETIT e AUDRAN, 1996). A recuperação deve ser estudada em replicado e em pelo menos 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) representativas da gama de concentrações esperada, comparando os resultados analíticos de amostras extraídas com aqueles de soluções não extraídas os quais representam 100% de recuperação (WIELING *et al.*, 1996; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

1.1.7 – Estabilidade na matriz biológica

A estabilidade dos fármacos e/ou metabolitos nas matrizes biológicas depende das condições de armazenamento, do sistema de acondicionamento, das propriedades químicas das substâncias, do tipo de matriz e até da espécie animal (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Um pré-requisito fundamental para garantir que os resultados quantitativos obtidos são fidedignos é a estabilidade dos analitos ao longo de todo o procedimento bioanalítico. Como a degradação dos analitos é susceptível de ocorrer nas matrizes biológicas, é importante documentar a estabilidade destes entre a colheita e a

análise das amostras. Assim, no processo de validação de um método analítico devem ser incluídos ensaios de estabilidade na matriz biológica, para todos os analitos, nas condições típicas de processamento e armazenamento das amostras (PETERS e MAURER, 2002).

Os ensaios de estabilidade dos analitos na matriz biológica compreendem, geralmente, a avaliação a curto prazo para simular as condições normais de colheita e tratamento das amostras (temperatura ambiente ou 4°C; 4-24 horas), estudos a longo prazo para estimar o tempo em que é possível manter as amostras armazenadas sem degradação considerável (-20°C, -70°C ou outras; vários meses) e ensaios após ciclos de congelação/descongelação para a necessidade de possíveis reanálises. A instabilidade dos analitos, para além de poder ocorrer na matriz biológica, também pode ocorrer nos extractos das amostras processadas, conseqüentemente, podem ser realizados estudos de estabilidade nas condições de armazenamento prévias à análise. Nos estádios iniciais da descoberta e do desenvolvimento de novos fármacos, em que a estabilidade dos padrões e do Pi nas soluções stock é desconhecida, é essencial demonstrar o período de estabilidade nas respectivas soluções.

Na validação de um método bioanalítico, a estabilidade dos analitos na matriz biológica é testada por comparação dos resultados obtidos em amostras de CQ, analisadas antes (amostras de referência) e depois de serem submetidas às condições dos ensaios de estabilidade (amostras de estabilidade). Os estudos de estabilidade devem ser executados no mínimo em dois níveis de concentração (baixo e alto) representativos da gama de calibração e, pelo menos, em triplicado (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Os analitos podem considerar-se estáveis na matriz biológica quando as razões entre a média das respostas para as amostras de estabilidade e de referência estão compreendidas no intervalo entre 90-110%. Outros limites de aceitação podem ser apropriados desde que sejam definidos *a priori* (DADGAR e BURNETT, 1995). CHENG e colaboradores (2005) ao validar uma técnica analítica de LC-MS-MS para a quantificação da metaciclina, em plasma humano, consideraram como critério de estabilidade um desvio de 85-115%.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fármacos e Reagentes

Os fármacos de referência e o Pi requeridos para o desenvolvimento e validação desta técnica analítica foram cedidos pelos Laboratórios BIAL (Portela & Ca. S.A.; Porto, Portugal). As estruturas químicas correspondentes estão representadas na figura III.1.

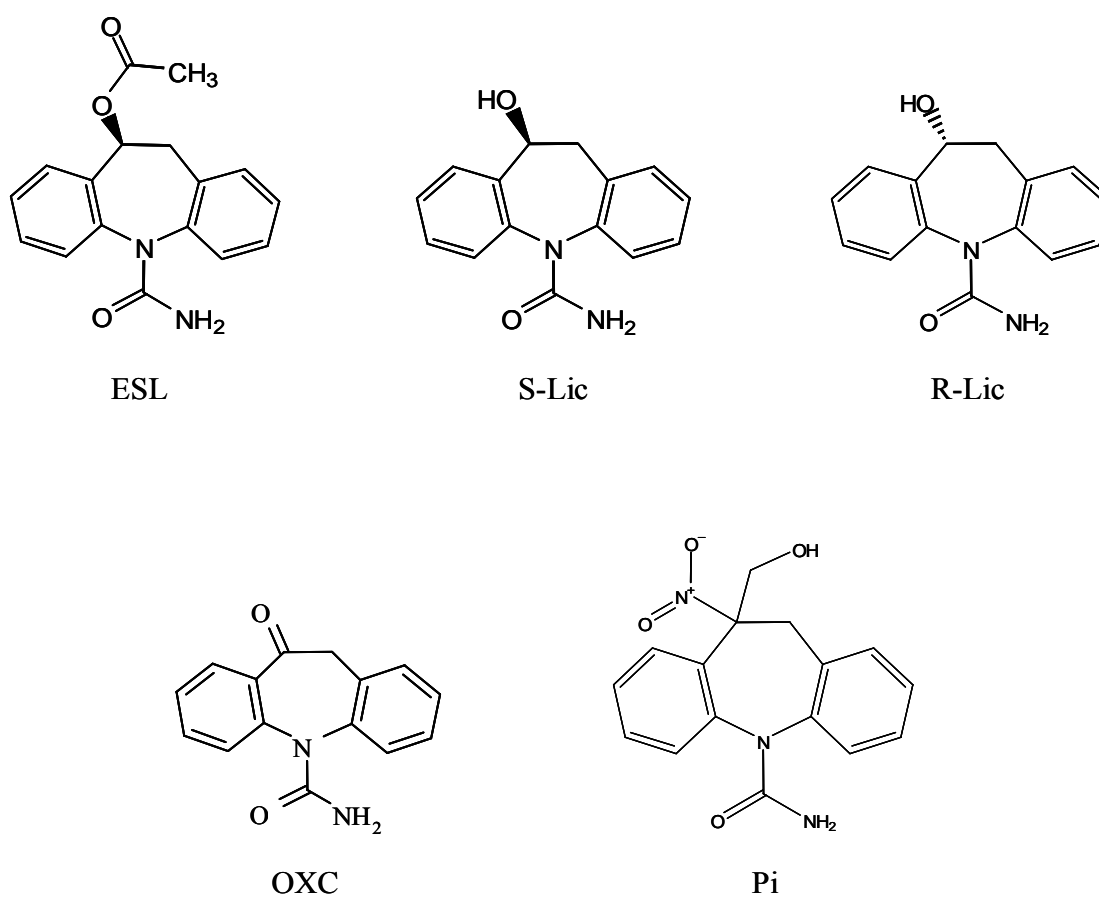


Figura III.1 – Estruturas químicas do ESL (nome de código: BIA 2-093), S-Lic (nome de código: BIA 2-194), R-Lic (nome de código: BIA 2-195), OXC e Pi (nome de código: BIA 2-265).

A percentagem de pureza dos padrões por LC foi de 100% para o ESL [(S)-(-)-10-acetoxy-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide; lote 0000012976], de 99,79% para o enantiómero S-Lic [(S)-(+)-10-Hydroxy-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide; lote PC020131B], de 100% para o enantiómero R-Lic [(R)-(-)-10-Hydroxy-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide; lote PC040414], superior a 98% para a OXC [10,11-Dihydro-10-oxo-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide; lote 97.12.17] e de 97,4% para o Pi [10-Hydroxymethyl-10-nitro-10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamide; lote PC050704].

Para a execução dos ensaios experimentais conducentes à validação deste método analítico também foram empregues os reagentes mencionados na tabela III.1.

Tabela III.1 – Reagentes usados na quantificação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano pelo método de LC desenvolvido.

Reagentes			
Metanol grau gradiente	CH ₃ OH	cromatografia líquida	SDS [®]
Água ultra-pura (>15 MΩ)	H ₂ O	cromatografia líquida	UCQ ^a
Metanol	CH ₃ OH	<i>pro analysis</i>	Merck [®]
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	<i>pro analysis</i>	Merck [®]
Acetato de etilo	CH ₃ COOC ₂ H ₅	<i>pro analysis</i>	Merck [®]
Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	<i>pro analysis</i>	Merck [®]
Hidrogenofosfato de sódio dihidratado	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	<i>pro analysis</i>	Merck [®]
Ácido clorídrico fumante 37%	HCl	<i>pro analysis</i>	Merck [®]

^a Unidade de Controlo de Qualidade do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2.2 – Matriz Biológica

Os brancos de plasma humano foram cedidos pelo Centro Regional de Sangue de Coimbra, após consentimento informado e escrito de indivíduos dadores de sangue. Toda a documentação referente a este processo está arquivada no Centro Regional de Sangue de Coimbra.

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

As soluções *stock* de ESL (2 mg/mL), S-Lic (10 mg/mL), R-Lic (10 mg/mL), OXC (2 mg/mL) e Pi (1 mg/mL) foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas de cada um destes compostos em acetonitrilo. Posteriormente, as soluções correspondentes foram diluídas adequadamente com acetonitrilo para produzir soluções a 2 mg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic e, de seguida, prepararam-se soluções a 200 µg/mL para todos os fármacos-padrão (ESL, S-Lic, R-Lic e OXC). A partir das soluções individuais preparadas foram obtidas 5 soluções combinadas contendo os quatro compostos nas concentrações finais de 10, 50, 500, 1000 e 2000 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic, e de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL para o ESL e OXC. Uma solução de trabalho do Pi a 200 µg/mL também foi preparada diluindo apropriadamente a respectiva solução *stock*. As soluções dos padrões foram armazenadas durante um mês, protegidas da luz, a aproximadamente 4°C, excepto a solução de trabalho do Pi cuja preparação foi efectuada diariamente.

Os padrões ou amostras de calibração foram preparados a 0,4, 0,8, 2, 4 e 8 µg/mL para o ESL e OXC, e a 0,4, 2, 20, 40 e 80 µg/mL para os enantiómeros S-Lic e R-Lic, pela adição de quantidades conhecidas das soluções combinadas apropriadas em branco de plasma humano. Na figura III.2 está esquematizada a preparação dos padrões de calibração em plasma humano. As amostras de CQ também foram preparadas, independentemente, em branco de plasma humano.

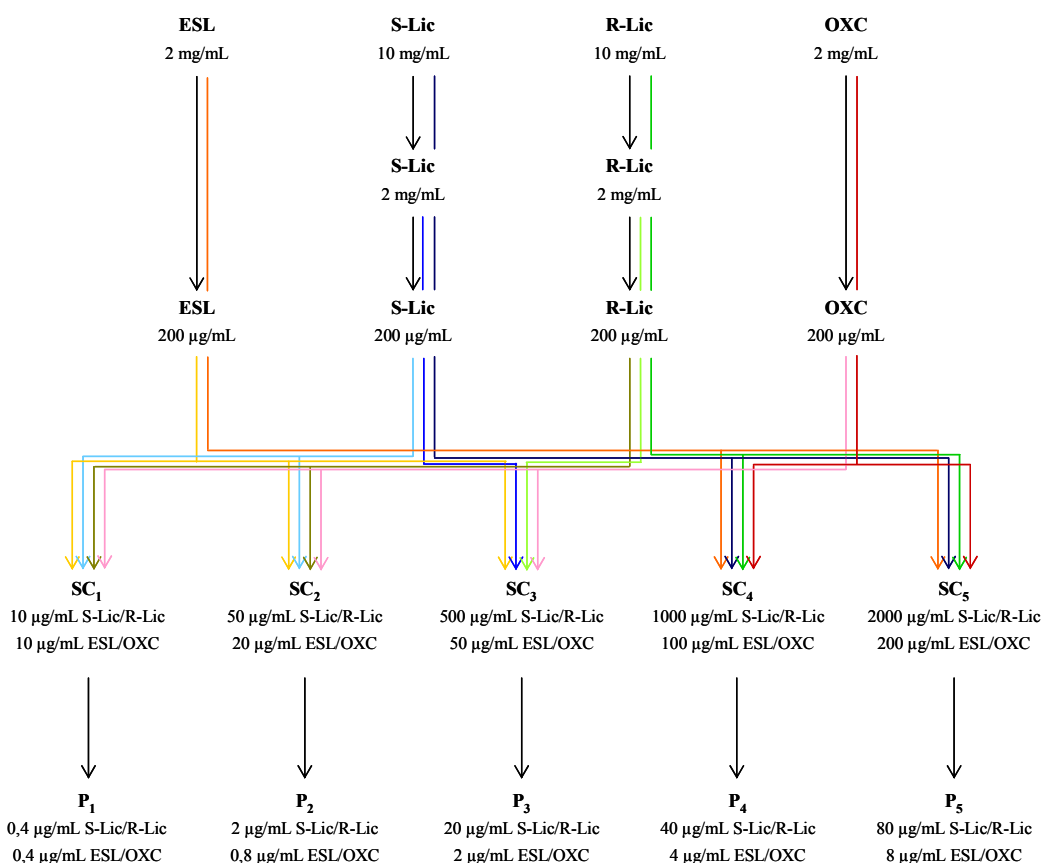


Figura III.2 – Preparação dos padrões de calibração em plasma humano (P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅) usando 5 soluções combinadas (SC₁, SC₂, SC₃, SC₄ e SC₅) como soluções intermédias.

2.4 – Preparação das Amostras

A extracção em fase sólida (SPE – *Solid-phase extraction*) foi a metodologia seleccionada para extrair os analitos e o Pi das amostras de plasma a analisar. O procedimento de SPE foi executado num sistema *vacuum manifold Whatman*[®] e os passos da extracção foram desenvolvidos com base em métodos já publicados (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001; MANDRIOLI *et al.*, 2003).

As amostras a extrair foram preparadas pela adição de 250 µL de plasma humano a 750 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 5) fortificado com 10 µL da solução de trabalho do Pi. A mistura obtida foi agitada no vórtex durante cerca de 10 s e transferida para um cartucho de extracção Waters Oasis[®] HLB (30 mg/1 mL; Waters, Milford, MA, USA), previamente acondicionado com 1 mL de metanol, 1 mL de acetonitrilo e 1 mL água-acetonitrilo (95:5, v/v). A eluição da amostra através do

enchimento do cartucho possibilita a adsorção dos analitos e do Pi enquanto as impurezas são eliminadas. Uma vez eluída a amostra, para maximizar a remoção de possíveis interferentes, os cartuchos foram submetidos a um vácuo de -30 kPa e lavados duas vezes com 1 mL de água e duas vezes com 1 mL de água-acetonitrilo (95:5, v/v). Após a fase de lavagem procedeu-se à secagem do adsorvente sob vácuo (-30 kPa) durante 5 min. De seguida, os analitos e o Pi foram eluídos com 1 mL de acetato de etilo, sob condições de vácuo ligeiro, com posterior secagem do adsorvente a -30 kPa (30 s). O eluato obtido foi evaporado à secura sob uma corrente de azoto a 45°C e o resíduo seco reconstituído em 100 µL de fase móvel por agitação no vórtex (30 s) e nos ultra-sons (1 min). O extracto reconstituído foi transferido para um filtro de centrifuga Spin-X (0,22 µm) e filtrado por centrifugação a 13400 rotações por minuto (rpm) durante 2 min, obtendo-se o extracto final preparado para a injeção no sistema de LC. Na figura III.3 estão esquematizadas as principais etapas do procedimento de preparação das amostras.

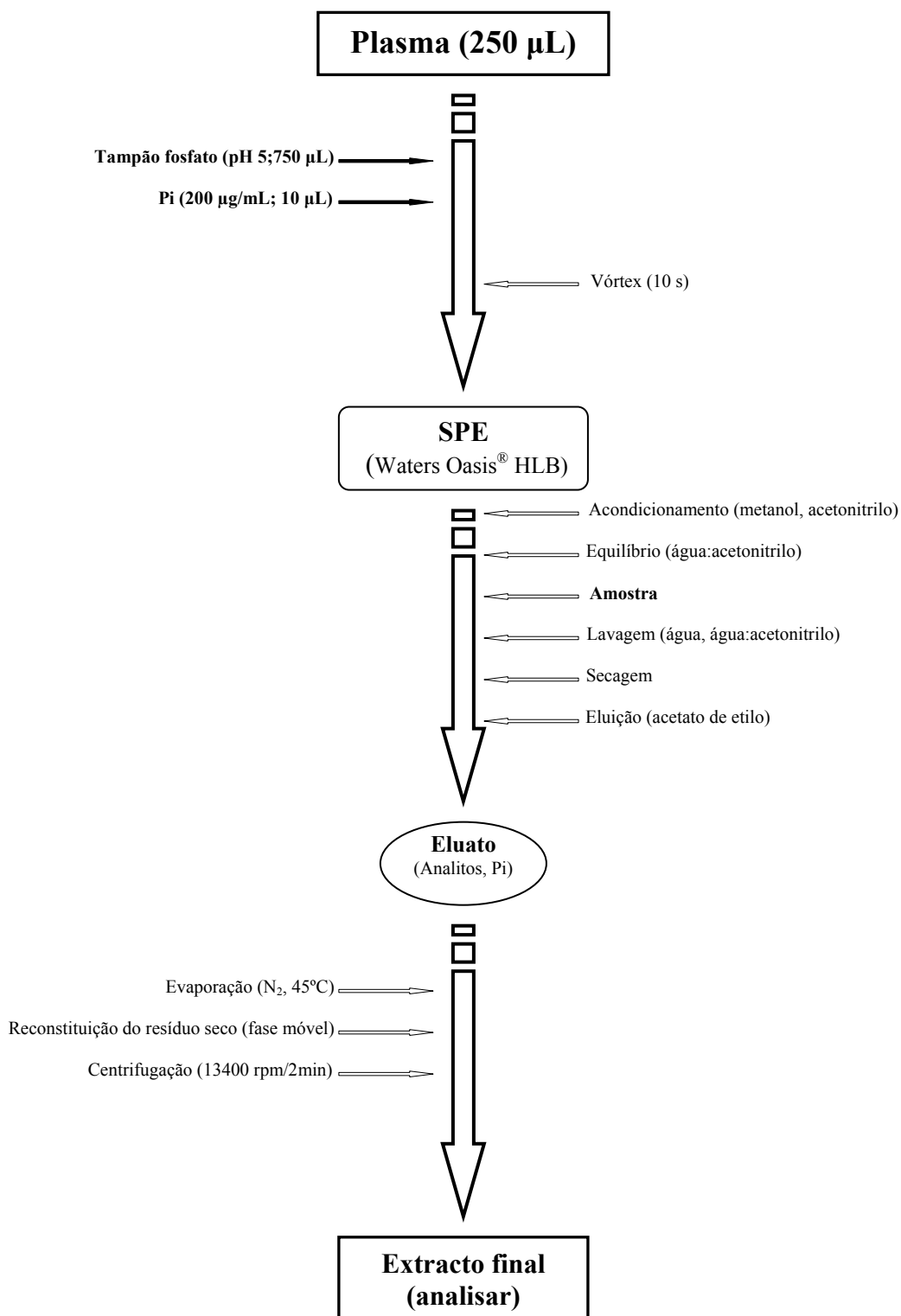


Figura III.3 – Esquema de preparação das amostras de plasma humano.

2.5 – Equipamento e Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas para o desenvolvimento e validação da técnica analítica que aqui se apresenta foram efectuadas num sistema de LC BAS-480, equipado com uma bomba PM-80, um injector manual Rheodyne com um bucle de 20 μL , um detector BAS UV-116 de ultravioleta-vísivel, um forno BAS LC-22C para o controlo da temperatura das colunas e um sistema de interface BAS DA-5 para o controlo e aquisição de dados (*Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA*). Para o processamento e a integração dos dados utilizou-se a versão 2.30 do software BAS Chromgraph Control and Chromgraph Report.

As condições cromatográficas usadas para a separação e quantificação dos quatro analitos (ESL, S-Lic, R-Lic e OXC) e do Pi estão resumidas na tabela III.2. A análise cromatográfica decorreu a 30°C, mediante eluição isocrática com água-metanol (88:12, v/v), a um fluxo de 0,7 mL/min, numa coluna cromatográfica quiral de fase reversa LiChroCART 250-4 Chiradex (β -ciclodextrinas, 5 μm) protegida por um guarda-coluna LiChroCART 4-4 Chiradex (β -ciclodextrinas, 5 μm) provenientes da *Merck*[®]. A fase móvel foi previamente filtrada por um filtro de membrana de 0,45 μm e desgaseificada num banho de ultra-sons durante 15 min.

Tabela III.2 – Condições cromatográficas do método de LC desenvolvido para a quantificação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano.

Parâmetros cromatográficos	
Coluna cromatográfica	LiChroCART 250-4 Chiradex (β -ciclodextrinas, 5 μm)
Guarda-coluna	LiChroCART 4-4 Chiradex (β -ciclodextrinas, 5 μm)
Temperatura da coluna	30°C
Fase móvel	Isocrática, água-metanol (88:12, v/v)
Fluxo	0,7 mL/min
Detecção	225 nm
Volume de injeção	20 μL
Tempo de análise	28 min

2.6 – Validação do Método Quiral de LC-UV em Plasma Humano

O método quiral de LC-UV desenvolvido para a determinação quantitativa do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, em plasma humano, foi validado de acordo com as recomendações gerais publicadas nos últimos anos acerca da validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros de fiabilidade estudados foram a selectividade, a curva de calibração, os limites de quantificação e de detecção, a precisão e a exactidão, a influência da diluição da amostra, a recuperação e a estabilidade dos analitos em plasma humano.

2.6.1 – Selectividade

A selectividade do método foi estudada, atendendo, por um lado, à presença de possíveis interferentes endógenos da matriz de plasma humano com os analitos de interesse (ESL, S-Lic, R-Lic, OXC e Pi) e, por outro lado, considerando eventuais interferências de fármacos comumente administrados aos doentes epiléticos. Na primeira situação, seis extractos de amostras brancas de plasma humano, provenientes de seis indivíduos diferentes, foram analisados para testar potenciais interferentes endógenos. Na segunda situação foram testadas soluções de diversos fármacos: antiepiléticos (PB, PHT, CBZ, VPA, FBM, GBP, VGB, LTG, TPM e LEV), antidepressivos (dotiepina, mirtazapina, sertralina, trazodone, escitalopram e paroxetina), ansiolíticos ou hipnóticos (diazepam, cloxazolam, lorazepam e loflazepato de etilo) e antipsicóticos (risperidona, olanzapina, clorpromazina e zuclopentixol).

2.6.2 – Curvas de calibração e limites de quantificação e detecção

Para estudar a linearidade do método cromatográfico foram construídas curvas de calibração, em cinco dias diferentes ($n = 5$), com cinco amostras de calibração preparadas em branco de plasma humano e de concentrações compreendidas de 0,4-8 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e de 0,4-80 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic. As curvas de calibração foram determinadas considerando a razão entre a altura do pico do fármaco e a altura do pico do Pi (resposta cromatográfica) como função das respectivas

concentrações dos fármacos analisados. Os dados foram sujeitos à análise de regressão linear ponderada, usando como factor de ponderação o inverso do quadrado da concentração ($1/x^2$), o qual foi seleccionado atendendo às curvas geradas e à soma em valor absoluto da percentagem de erro relativo.

O LQ da técnica analítica para cada um dos fármacos a quantificar, em plasma humano, foi avaliado intra e interdia, em replicado ($n = 5$), na concentração mais baixa da respectiva gama de calibração. A concentração estudada foi de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic, considerando-se aceitável, no LQ, um CV que não exceda 20% e um *bias* dentro de $\pm 20\%$, respectivamente, para a precisão e exactidão.

O LD do método foi estimado para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic, por diluições sucessivas do padrão de calibração de menor concentração e foi estabelecido naquela concentração em que a razão sinal/ruído foi igual ou superior a 3.

2.6.3 – Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão dos resultados foram avaliadas, intra e interdia, em replicado ($n = 5$), através dos dados obtidos com amostras de CQ preparadas em plasma humano, em três concentrações diferentes representativas das gamas de calibração consideradas. As concentrações testadas foram 0,4, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e 0,4, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic. O critério de aceitação para a precisão foi um valor de CV que não exceda 15% (ou 20% no LQ) e para a exactidão um valor de *bias* dentro de $\pm 15\%$ (ou $\pm 20\%$ no LQ).

2.6.4 – Influência da diluição

A influência da diluição nas amostras de plasma humano foi investigada, na razão de 1:10, com amostras de CQ a 40 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC e a 400 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiómeros S-Lic e R-Lic, de forma a assegurar que as amostras de plasma humano com concentrações superiores à gama de calibração considerada possam ser diluídas com matriz branca de plasma humano e quantificadas com precisão e exactidão aceitáveis. A precisão e a exactidão na diluição de amostras de CQ foram avaliadas, em replicado ($n = 5$), em ensaios realizados intra e interdia.

2.6.5 – Recuperação

A recuperação dos analitos e do Pi a partir das amostras de plasma humano foi estudada, através de análises, em replicado ($n = 5$), nas concentrações de 0,4, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC, nas concentrações de 0,4, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiômeros S-Lic e R-Lic, e para o Pi na concentração empregue na análise das amostras de plasma (8 $\mu\text{g/mL}$). A recuperação para o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic foi estimada comparando a razão obtida entre as alturas dos picos fármaco/Pi, em amostras de plasma extraídas e nas soluções correspondentes não extraídas, as quais representam 100% de recuperação. A recuperação do Pi foi calculada pela razão entre as alturas dos picos do Pi obtidos em amostras de plasma extraídas e em soluções não extraídas.

2.6.6 – Estabilidade na matriz biológica

A estabilidade do ESL e dos seus metabolitos foi avaliada, em plasma humano, mediante a análise, em replicado ($n = 5$), de amostras de CQ nas concentrações de 0,8 e 4 $\mu\text{g/mL}$ para o ESL e OXC, e 2 e 40 $\mu\text{g/mL}$ para os enantiômeros S-Lic e R-Lic. A estabilidade foi estudada durante 24 h a 4°C e durante 30 dias a -30°C, simulando as condições de manipulação e de armazenamento das amostras que antecederam a análise. A estabilidade foi estimada por comparação dos dados obtidos a partir das amostras de CQ analisadas antes (amostras de referência) e depois (amostras de estabilidade) de expostas às condições de estabilidade previamente mencionadas. Como critério de estabilidade estabeleceu-se que a diferença em percentagem entre os dados resultantes das amostras de estabilidade e de referência deve estar compreendida em $\pm 15\%$.

3. RESULTADOS

3.1 – Separação Cromatográfica e Selectividade

A separação cromatográfica do Pi e dos analitos de interesse (R-Lic, S-Lic, OXC e ESL), em amostras de plasma humano, foi alcançada com sucesso usando a metodologia de SPE e as condições cromatográficas já descritas, respectivamente, nas *secções 2.3 e 2.4*. Perante estas condições analíticas, o último composto a eluir foi o ESL, com um tempo de retenção de aproximadamente 24 min, e a ordem de eluição foi a seguinte: Pi, R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (figura III.4B, C e D).

Na figura III.4 são apresentados os cromatogramas característicos de extractos de amostras brancas e de amostras fortificadas de plasma humano. A ausência de resposta nas amostras brancas de plasma humano aos tempos de retenção do Pi e dos analitos foi demonstrada a 225 nm.

Da mesma maneira, de entre os fármacos testados como possíveis interferentes, nenhum deles apresentou resposta cromatográfica aos tempos de retenção do Pi e dos compostos a quantificar com esta técnica analítica (ESL, S-Lic, R-Lic e OXC).

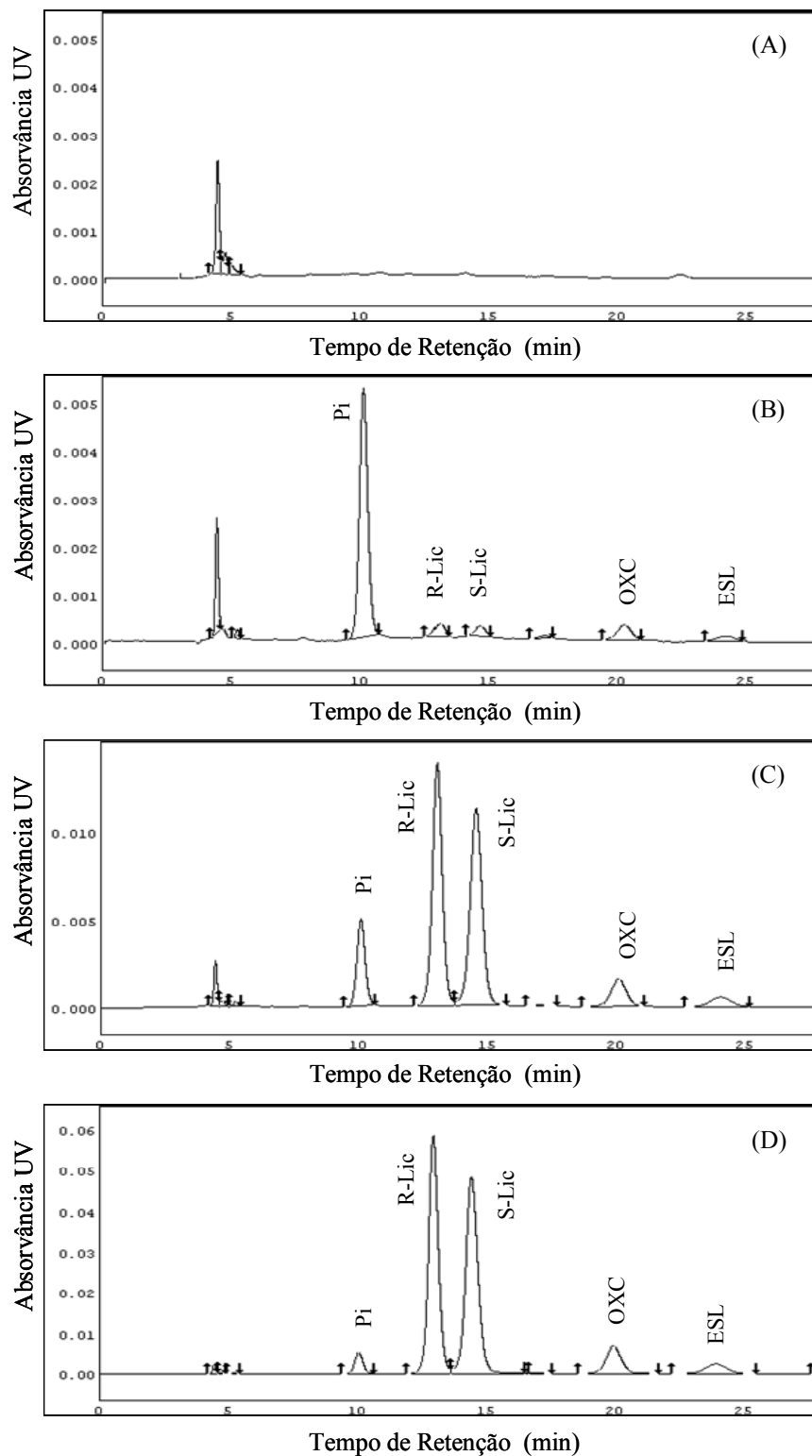


Figura III.4 – Cromatogramas representativos de extractos de plasma humano: (A) branco; (B) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic, S-Lic, OXC e ESL (0,4 µg/mL); (C) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic e S-Lic (20 µg/mL), OXC e ESL (2 µg/mL); (D) fortificado com Pi (8 µg/mL), R-Lic e S-Lic (80 µg/mL), OXC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

3.2 – Curvas de Calibração e Limites de Quantificação e Detecção

As curvas de calibração obtidas em plasma humano demonstraram linearidade para o ESL e OXC de 0,4-8 µg/mL e para os enantiómeros S-Lic e R-Lic de 0,4-80 µg/mL. As equações de regressão e os coeficientes de determinação (r^2) das curvas de calibração são apresentados na tabela III.3. Os resultados demonstram uma boa linearidade ($r^2 \geq 0,993$) para a razão das alturas dos picos fármaco/ P_i *versus* concentração.

Tabela III.3 – Curvas de calibração para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano (n = 5).

Matriz/Fármaco	Padrões calibração (µg/mL)	Equação de regressão ^a	r^2
Plasma			
ESL	0,4; 0,8; 2; 4; 8	$y = 0,0547x + 0,0005$	0,993
S-Lic	0,4; 2; 20; 40; 80	$y = 0,1086x - 0,0009$	0,998
R-Lic	0,4; 2; 20; 40; 80	$y = 0,1320x - 0,0005$	0,998
OXC	0,4; 0,8; 2; 4; 8	$y = 0,1609x - 0,0061$	0,998

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

Os LQ do método foram estabelecidos em 0,4 µg/mL para todos os analitos (ESL, S-Lic, R-Lic e OXC) e os LD foram de 0,1 µg/mL para o ESL e de 0,04 µg/mL para a OXC, S-Lic e R-Lic.

3.3 – Precisão e Exactidão

Os resultados da precisão e exactidão do método analítico, intra e interdia, obtidos com a análise de amostras de CQ, preparadas em plasma humano, estão resumidos na tabela III.4. Atendendo à globalidade dos dados analíticos, intra e interdia, o valor do CV foi $\leq 9,25\%$ e o *bias* variou entre -0,56% e 4,98%. Estes resultados indicaram que a técnica desenvolvida é precisa e exacta para a determinação quantitativa do ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma humano, pois os limites aceitáveis para a precisão e exactidão são cumpridos.

A precisão e a exactidão na análise das amostras de plasma diluídas (1:10) variaram, respectivamente, de 0,89% a 2,63% e de -1,96% a 0,38%. Estes resultados revelaram que a diluição de 10 vezes com branco de plasma humano branco pode ser

aplicada se a concentração das amostras de plasma a analisar exceder o limite superior da gama de calibração.

Tabela III.4 – Precisão (% CV) e exactidão (% Bias) intra e interdia para a quantificação do ESL, S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano (n = 5).

C _{Nominal} ^a	Ensaio							
	Intradia				Interdia			
	% CV	% Bias	% CV	% Bias	% CV	% Bias	% CV	% Bias
Plasma	ESL		OXC		ESL		OXC	
0,4	5,52	1,65	6,22	2,53	9,25	1,23	2,63	1,70
4	1,24	0,39	1,65	0,36	2,86	-0,56	1,20	-0,54
8	1,91	3,42	2,16	4,05	0,98	1,97	0,91	3,60
	S-Lic		R-Lic		S-Lic		R-Lic	
0,4	4,10	1,18	3,21	1,02	6,26	0,11	4,22	0,49
40	1,92	0,76	1,85	0,50	2,57	-0,38	2,60	-0,09
80	1,99	4,98	1,98	4,22	0,97	3,29	1,00	3,05

^a Concentração nominal (µg/mL).

3.4 – Recuperação

A recuperação dos analitos (ESL, OXC, S-Lic e R-Lic) a partir da matriz de plasma humano foi estimada e os resultados obtidos apresentam-se na tabela III.5.

Tabela III.5 – Recuperação (%) do ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma humano.

C _{Nominal} ^a	n ^b	Recuperação (%)			
		Média	% CV	Média	% CV
Plasma		ESL		OXC	
0,4	5	90,10	8,06	85,78	3,27
4	5	100,00	1,87	94,36	1,71
8	5	101,16	1,98	96,93	2,26
	15	97,09	6,67	92,36	5,71
		S-Lic		R-Lic	
0,4	5	97,36	5,38	102,09	4,71
40	5	104,09	1,38	104,99	1,24
80	5	101,57	1,33	101,49	1,30
	15	101,01	4,22	102,85	3,25

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

A análise dos dados revela que a recuperação média dos analitos é consistente na gama de concentrações considerada. Atendendo conjuntamente ao ESL e aos seus metabolitos, a recuperação média variou de 92,36% a 102,85% e os valores dos CV calculados foram relativamente baixos. A recuperação média do Pi a partir da mesma matriz foi de 84,99% com um CV de 2,78%.

3.5 – Estabilidade

Pode-se concluir, a partir dos dados de estabilidade obtidos, que não foi observada qualquer degradação significativa do ESL e dos seus metabolitos em plasma humano quando amostras fortificadas foram armazenadas por 24 h a 4°C ou durante um mês a -30°C (tabela III.6). Por isso, o ESL, OXC, S-Lic e R-Lic são estáveis na matriz de plasma humano nas condições estudadas.

Tabela III.6 – Estabilidade do ESL, OXC, S-Lic e R-Lic em plasma humano (n = 5).

Ensaio de estabilidade								
Plasma	Diferença em relação à amostra de referência (%)							
	ESL		OXC		S-Lic		R-Lic	
C _{Nominal} ^a	0,8	4	0,8	4	2	40	2	40
4°C (24 h)	1,85	-7,95	-6,50	-9,86	3,08	-4,35	2,25	-4,46
-30°C (30 dias)	8,95	-1,11	2,25	-3,94	4,56	-4,86	3,27	-5,47

^a Concentração nominal (µg/mL).

4. DISCUSSÃO

O método cromatográfico acabado de descrever constitui o primeiro método quiral de LC-UV desenvolvido e validado para a determinação quantitativa e simultânea do ESL e dos seus principais metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC na matriz de plasma humano. A disponibilidade de uma técnica analítica deste tipo representa um progresso científico relevante para a investigação clínica do ESL e, num futuro próximo, para a monitorização farmacoterapêutica na prática clínica, permitindo a individualização dos regimes posológicos nas populações especiais de doentes epiléticos.

Com o intuito de reduzir os recursos necessários e de otimizar o desenvolvimento do método, considerou-se como ponto de partida a informação experimental proveniente de outras técnicas cromatográficas anteriormente aplicadas em estudos pré-clínicos e clínicos com o ESL (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001; ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004). As técnicas de LC usadas no processo de desenvolvimento do ESL, muitas vezes, não diferenciaram os seus metabolitos S-Lic e R-Lic, sendo a mistura enantiomérica correspondente quantificada como Lic, tratavam-se pois de métodos cromatográficos sem capacidade de discriminação quiral (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001; ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004; MAIA *et al.*, 2005; FONTES-RIBEIRO *et al.*, 2005). Para avaliar a estereoselectividade nos processos de biotransformação do ESL e de outros compostos relacionados, em ratos e murganhos, HAINZL e colaboradores (2001) recorreram a uma técnica quiral de LC-MS, a qual permitiu a resolução dos enantiómeros S-Lic e R-Lic. Mais tarde, o perfil farmacocinético do ESL foi comparado em indivíduos saudáveis, jovens e idosos, mediante um método quiral de LC-MS que possibilitou a separação e a quantificação dos enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma humano (ALMEIDA *et al.*, 2005). Ao considerar, globalmente, as técnicas de LC referidas para a determinação quantitativa do ESL e dos seus metabolitos, o sistema de detecção usado em quase todos os ensaios foi a MS. Uma técnica de LC-UV foi aplicada, por uma única vez, na quantificação do ESL, Lic e OXC em plasma humano (ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003), a qual não permitiu a resolução dos enantiómeros S-Lic e R-Lic.

Os enantiómeros R-Lic e S-Lic são estereoisómeros que só diferem no arranjo espacial dos grupos substituintes ligados ao centro quiral (ponto de assimetria dentro da molécula). Como os enantiómeros possuem propriedades físicas e químicas idênticas,

diferenciando-se apenas pelo sentido de rotação do plano da luz polarizada e pelas interações em meios quirais, a separação enantiomérica tem sido considerada um dos maiores desafios da química (HAN, 1997). Efectivamente, a resolução dos enantiómeros R-Lic e S-Lic constituiu a etapa crítica do desenvolvimento do método quiral de LC-UV apresentado. O maior tempo de retenção do enantiómero S-Lic em relação ao seu antípode R-Lic demonstra a maior estabilidade dos complexos diastereoméricos transitoriamente formados com a fase estacionária quiral de β -ciclodextrinas, eluindo o enantiómero S-Lic mais tardiamente que o enantiómero R-Lic. As β -ciclodextrinas têm sido largamente usadas como selectores quirais na separação de enantiómeros e possuem propriedades únicas, nomeadamente a capacidade de formarem, em soluções aquosas, cavidades hidrofóbicas com as faces exteriores hidrofílicas (HAN, 1997; WANG e CHING, 2002). A discriminação quiral entre os enantiómeros S-Lic e R-Lic na fase estacionária de β -ciclodextrinas deve-se-á, possivelmente, a diferenças no ajuste estérico dos enantiómeros às cavidades hidrofóbicas das β -ciclodextrinas e à diferente capacidade para estabelecer ligações de hidrogénio, embora outras interações intermoleculares possam também contribuir para a resolução enantiomérica.

Como a quiralidade é uma característica comum à maioria das macromoléculas biológicas, nos sistemas vivos cada enantiómero pode exibir propriedades farmacológicas e toxicológicas distintas (MISL'ANOVÁ e HUTTA, 2003). Por isso, as agências reguladoras requerem, presentemente, estudos referentes não só à mistura racémica como também a cada um dos enantiómeros antes da aprovação de comercialização de um novo fármaco quiral (WANG e CHING, 2002). Nos últimos anos o interesse crescente da separação enantiomérica, associado ao desenvolvimento e à comercialização de novas fases estacionárias quirais, tem proporcionado o aparecimento de inúmeras técnicas enantioselectivas de LC para suportar as etapas de síntese e de avaliação de novos compostos quirais (HAN, 1997).

Atendendo ao custo elevado dos detectores MS e à sua disponibilidade limitada em muitos laboratórios e hospitais (VELPANDIAN *et al.*, 2004; JANCHAWEE *et al.*, 2007), bem como aos aspectos regulamentares inerentes ao desenvolvimento de fármacos quirais, facilmente se compreende o interesse do método enantioselectivo de LC-UV desenvolvido para quantificar simultaneamente o ESL, a OXC e os enantiómeros S-Lic e R-Lic em plasma humano (ALVES *et al.*, 2007a).

Como discutido no capítulo II, os pró-fármacos ESL e OXC, após a administração ao homem, são rápida e extensamente convertidos nos metabolitos

activos S-Lic e R-Lic, ainda que em diferentes proporções. Porém, embora a OXC seja utilizada na prática clínica há diversos anos, poucos foram os estudos efectuados que diferenciaram os enantiómeros S-Lic e R-Lic. Muitos factores podem ter contribuído para tal situação, nomeadamente, a inexistência de técnicas cromatográficas simples e económicas capazes de discriminar aqueles enantiómeros. De facto, apenas três técnicas cromatográficas enantioselectivas tinham sido publicadas para quantificar a OXC e os enantiómeros S-Lic e R-Lic, as quais empregavam colunas cromatográficas de fase normal, cuja fase móvel era constituída por solventes tóxicos, poluentes e muito dispendiosos: *n*-hexano:2-propanol (FLESCH *et al.*, 1992), *n*-hexano:etanol (PICHINI *et al.*, 1995) e *n*-hexano:etanol:2-propanol com ácido acético glacial (VOLOSOV *et al.*, 2000). Pelo contrário, inúmeras técnicas cromatográficas aquirais têm sido desenvolvidas para quantificar a OXC e a Lic (NOIRFALISE e COLLINGE, 1983; MENGE e DUBOIS, 1983; MENGE e DUBOIS e BAUER, 1987; ELYAS, GOLDBERG e PATSALOS, 1990; ROUAN *et al.*, 1994; PIENIMAKI *et al.*, 1995; SOUPPART *et al.*, 2001; BUGAMELLI *et al.*, 2002; LEVERT, ODOU e ROBERT, 2002; MAURER *et al.*, 2002; MANDRIOLI *et al.*, 2003; BRETON *et al.*, 2005; FRANCESCHI e FURLANUT, 2005; LANCKMANS *et al.*, 2006; GREINER e HAEN, 2007).

Na realidade, a avaliação da disposição enantioselectiva da OXC e dos seus metabolitos activos S-Lic e R-Lic ainda hoje continua a ser alvo de interesse. Esta ideia é comprovada pela publicação recente de um método quirais em fase reversa de LC-UV para a determinação quantitativa da OXC e dos seus metabolitos S-Lic e R-Lic em plasma humano (MAZZUCHELLI *et al.*, 2007). Este método analítico foi publicado, curiosamente, no mesmo mês (Junho) em que ficou disponível “on-line” o método por nós desenvolvido para determinar o ESL, a OXC e os enantiómeros S-Lic e R-Lic (ALVES *et al.*, 2007a). Ao confrontar este método com aquele publicado por MAZZUCHELLI e colaboradores (2007) é legítimo apontar como vantagens o procedimento de preparação das amostras por SPE, a eluição isocrática, a ausência de sais na fase móvel, a gama de calibração mais alargada e a maior rapidez de análise no primeiro método, e o menor limite de quantificação no segundo método. Estes dois métodos cromatográficos desenvolvidos e validados recentemente têm como vantagem decisiva o facto de funcionarem em fase reversa, permitindo a utilização de fases móveis aquosas.

Em conclusão, o método enantioselectivo descrito neste capítulo constitui o primeiro método de LC-UV para a determinação quantitativa e simultânea do ESL,

S-Lic, R-Lic e OXC em plasma humano. Tecnicamente, envolve condições cromatográficas simples e económicas e o procedimento de preparação das amostras (SPE) oferece muitos benefícios em relação à extracção líquido-líquido. Além disso, o método mostrou ser selectivo, linear, sensível, preciso e exacto numa gama de concentrações alargada, tornando-se numa ferramenta analítica importante para suportar estudos farmacocinéticos, de biodisponibilidade e de bioequivalência, e para a monitorização farmacoterapêutica dos metabolitos activos do ESL e da OXC em populações especiais de doentes.