



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas*

*Campus de Araraquara*

**Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de tiazolilhidrazona-9 (TZH-9) e determinação da estabilidade em plasma *ex vivo*.**

Orientada: Evelin dos Santos Martins

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

EVELIN DOS SANTOS MARTINS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE TIAZOLILHIDRAZONA-9 (TZH-9) E DETERMINAÇÃO DA  
ESTABILIDADE EM PLASMA *EX VIVO*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosângela Gonçalves Peccinini

ARARAQUARA

2015

## **Agradecimentos**

**A Deus**, por me conceder a vida e, com ela, a oportunidade de realizar nossos sonhos. Agradeço pela Tua presença durante todo este percurso, que me conduziu, animou, deu esperanças e a certeza de que alcançaria esse momento grandioso, apesar das dificuldades.

**Aos meus pais**, Clóvis e Vanda, que instruíram meus caminhos com sabedoria e dedicação. Obrigada por viverem comigo o meu sonho e estarem sempre presentes me incentivando, orientando e orando por mim. Se hoje concluo mais esta etapa da minha vida, é graças ao esforço de vocês, que sempre batalharam para me dar o melhor. Amo vocês.

**Ao meu irmão**, Vinícius, pela amizade e por tudo que fez e faz parte da nossa vida.

**Ao meu namorado**, Gustavo, pelas palavras de carinho e incentivo que me ajudaram e animaram todos os dias. Obrigada por ser o melhor amigo e companheiro desta caminhada.

**A minha família**, grande família, que, em todos os momentos, torceram por mim e se alegraram comigo.

**Aos meus amigos**, que me acompanharam em cada momento da minha vida, e tornaram-na muito mais divertida e alegre.

**A minha orientadora**, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosângela Gonçalves Peccinini, pela oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica e pelo prazer de vivenciar do seu amor pela pesquisa e pela docência, que inspira a todos seus alunos.

**Aos amigos do laboratório**, Elias, Michel, Juliana, Martina, Carol, Marcelo, Marco Antônio, Emiliana, Pedro, Taisa e Jonata, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês, não teria conhecimento, capacidade e força que necessitei durante todo este tempo.

Em especial, agradeço ao Elias e Michel, pelo imenso suporte dado diante de todos problemas que enfrentei. Obrigada pela paciência, disposição, instrução e dedicação que me deram. Também, agradeço à Juliana, que me acolheu no laboratório como uma mãe. Além de compartilhar seus conhecimentos, compartilhou conselhos e segredos, que tornaram nossa amizade muito especial.

**Aos funcionários do Laboratório de Bioequivalência**, Kelly, Marcos e Andreia, que prontamente me auxiliaram durante a pesquisa.

**A todos**, que me ajudaram e incentivaram durante esta caminhada, pois a tornaram mais leve e feliz.

*“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”.*

Jean de La Bruyère

## Sumário

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

1. Introdução .....	13
2. Objetivos .....	17
3. Materiais e Métodos .....	17
3.1. Materiais .....	17
3.1.1. Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica.....	17
3.1.2. Equipamentos .....	17
3.1.3. Softwares .....	18
3.2. Métodos .....	18
3.2.1. Desenvolvimento do método bioanalítico .....	18
3.2.2. Validação do método bioanalítico.....	23
3.2.3. Determinação da estabilidade <i>ex vivo</i> do TZH-9 em plasma de ratos e humanos .....	25
4. Resultados .....	26
4.1 Espectro de Absorção .....	26
4.2. Sistema Cromatográfico.....	26
4.3. Desenvolvimento do método bioanalítico.....	27
4.3.1. Precipitação de proteínas com acetonitrila.....	27

4.3.2. Extração com acetato de etila .....	28
4.3.3. Extração com acetato de etila em meio ácido .....	31
4.3.4. Extração com acetato de etila em meio básico .....	32
4.3.5. Extração com hexano.....	33
4.3.6. Extração com acetato de etila e hexano .....	34
4.3.7. Extração com mistura de hexano e acetato de etila (70:30) .....	36
4.3.8. Extração com acetonitrila e hexano .....	37
4.3.9. Extração com solução saturada de sulfato de zinco e acetato de etila ....	37
4.3.10. Extração com solução saturada de sulfato de amônio e acetato de etila .....	38
4.4. Validação do método bioanalítico .....	39
4.4.1. Seletividade.....	39
4.4.2. Linearidade .....	40
4.4.3. Efeito Residual .....	42
4.4.4. Precisão e Exatidão .....	42
4.4.5. Estabilidade de armazenamento.....	42
4.5. Estabilidade <i>ex vivo</i> do TZH-9 em plasma de ratos e plasma de humanos....	43
5. Discussão.....	47
5.1. Desenvolvimento do método bioanalítico.....	47
5.2. Estabilidade <i>ex vivo</i> do TZH-9 em plasma de ratos e plasma de humanos....	50
6. Conclusão .....	50
7. Referências .....	51

## Lista de Ilustrações

Figura 1 - Estrutura molecular do tiazolilhidrazona -9 (TZH-9).....	15
Figura 2 - Espectro de absorção do TZH-9 nos comprimentos de onda de 200 a 900nm. ....	26
Figura 3 - Cromatogramas da solução de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL nos comprimentos de onda de 262 e 331nm. ....	27
Figura 4 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetonitrila no comprimento de onda de 331nm. ....	28
Figura 5 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetonitrila no comprimento de onda de 331nm. ....	28
Figura 6 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetato de etila no comprimento de onda de 262nm. ....	29
Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetato de etila no comprimento de onda de 262nm. ....	30
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetato de etila no comprimento de onda de 331nm. ....	30
Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetato de etila no comprimento de onda de 331nm. ....	31

Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetato de etila em meio ácido no comprimento de onda de 331nm. ....	32
Figura 11 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL com acetato de etila em meio ácido no comprimento de onda de 331nm. ....	33
Figura 12 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL com hexano no comprimento de onda de 262nm. .	34
Figura 13 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL com hexano no comprimento de onda de 331nm. .	34
Figura 14 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetato de etila e hexano no comprimento de onda de 262nm. ....	35
Figura 15 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetato de etila e hexano no comprimento de onda de 331nm. ....	35
Figura 16 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL com mistura de hexano e acetato de etila (70:30) no comprimento de onda de 262nm.....	36
Figura 17 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL com mistura de hexano e acetato de etila (70:30) no comprimento de onda de 331nm.....	36
Figura 18 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetonitrila e hexano no comprimento de onda de 262nm. ....	37



Figura 19 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 2,5 e 5,0 µg/mL com solução saturada de sulfato de zinco e acetato de etila no comprimento de onda de 331nm.....	38
Figura 20 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 3,0 e 8,0 µg/mL com solução saturada de sulfato de amônio e acetato de etila no comprimento de onda de 331nm.....	39
Figura 21 - Cromatograma do TZH-9 (azul) sobreposto ao cromatograma da amostra branco (vermelho), apresentando a seletividade do método.....	40
Figura 22 - Aproximação do cromatograma do TZH-9 (azul) sobreposto ao cromatograma da amostra branco (vermelho), apresentando a seletividade do método. ....	40
Figura 23 - Curva de linearidade do TZH-9 em plasma. ....	41
Figura 24 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos (1500 ng/mL). A partir de 2 horas, $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).....	44
Figura 25 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos (6000 ng/mL). A partir de 4 horas, $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).....	45
Figura 26 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de humanos (1500 ng/mL). A partir de 15 minutos, $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey). ....	46
Figura 27 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de humanos (6000 ng/mL). A partir de 15 minutos, $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey). ....	47

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação entre as concentrações e as exatidões obtidas a partir de regressão linear e regressão não linear ( $1/y^2$ ).....	41
Tabela 2 - Precisão e exatidão do método bioanalítico.....	42
Tabela 3 - Estabilidade de armazenamento do TZH-9.....	43
Tabela 4 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de ratos na concentração de 1500 ng/mL.*Apresenta diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey). ....	44
Tabela 5 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de ratos na concentração de 6000 ng/mL. *Apresenta diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey). ....	45
Tabela 6 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de humanos na concentração de 1500 ng/mL. *Apresenta diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey). ....	46
Tabela 7 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de humanos na concentração de 6000 ng/mL. *Apresenta diferença estatística significativa ( $p<0,001$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey). ....	47

## Lista de Abreviaturas

$\lambda$  – Comprimento de onda

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BNZ – benznidazol

CQA – Controle de Qualidade Alto

CQB – Controle de Qualidade Baixo

CQM – Controle de Qualidade Médio

CV – Coeficiente de variação

DMSO – dimetilsulfóxido

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IC<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% das células

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

NaOH – hidróxido de sódio

nm – Nanômetro

PAHO – Pan American Health Organization

PI – Padrão interno

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

TCA – ácido tricloroacético

TZH-9 – tiazolilhidrazona-9

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

UV-VIS-FLR – Ultravioleta - Visível - Fluorescência

WHO – World Health Organization

## Resumo

A doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que acomete o sistema digestivo e, principalmente, o cardíaco. É uma doença endêmica principalmente nos países da América Latina. A busca por novos fármacos para o tratamento dessa doença é de suma importância já que os existentes podem causar severos efeitos adversos e são efetivos somente na fase aguda. A molécula tiazolilhidrazona-9 (TZH-9) tem se destacado como uma excelente candidata a fármaco para tratamento da doença de Chagas e a continuidade de seu desenvolvimento deve envolver estudos de farmacocinética e metabolismo. Para a realização destes estudos é necessário o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para a determinação do composto em plasma, assim como avaliar a estabilidade do fármaco nesta matriz biológica com o intuito de verificar a ação de enzimas plasmáticas. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado o método bioanalítico para quantificar o TZH-9 em plasma de ratos e humano que apresentou limites de confiança adequados. Também, avaliou-se a estabilidade do TZH-9 nessas matrizes biológicas, em plasma de ratos, o composto apresentou instabilidade após 2 horas na concentração inferior, sugerindo ação de enzimas plasmáticas no seu metabolismo; e em plasma de humanos, apresentou instabilidade após 15 minutos em ambas concentrações, sugerindo a susceptibilidade a ação das enzimas plasmáticas.

## 1. Introdução

A doença de Chagas é uma doença parasitária, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que acomete o sistema digestivo e, principalmente, o cardíaco. É transmitida para humanos por insetos hematófagos Triatomíneos que são comumente encontrados em áreas rurais com condições de habitação precárias, entretanto, existem outras vias de transmissão que envolvem vetores como transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplantes de órgãos ou por via oral (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

A doença apresenta-se com manifestações de fase aguda e de fase crônica. Muitos casos são assintomáticos na fase aguda, contudo, pode-se apresentar um quadro clínico inicial caracterizado por febre prolongada, cefaleia, edema de face ou membros, manchas na pele, aumento do fígado ou baço, cardiopatia aguda, dentre outros. A fase crônica pode afetar o coração com distúrbios de condução, arritmia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo secundário; e causar lesões digestivas como megaesôfago e megacólon (WHO, 2013).

É endêmica nos países da América e, segundo a Organização de Saúde Pan-americana (PAHO, 2014), estima-se que, na região, cerca de 100 milhões de pessoas estão em risco de infecção, 8 milhões infectadas, com 56 mil novos casos por ano para todas as formas de transmissão, gerando 12 mil mortes por ano. No Brasil, em 2012, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 160 novos casos confirmados no primeiro ano dos sintomas, sendo 156 (97,5%) na região norte, 2 (1,25%) na região sudeste e 1 (0,625%) na região nordeste e sul (DATASUS, 2012).

Os primeiros compostos testados experimentalmente por Mayer em 1912 e Rocha Lima em 1914 para o tratamento da doença de Chagas foram atoxil

(arsênico), fucsina (corante rosanilin), tártaro emético e cloreto de mercúrio, mas nenhum apresentou resultados eficazes (COURA; CASTRO, 2002). Brener (apud COURA; CASTRO, 2002) fez uma revisão meticulosa dos fármacos testados até o início da década de 60, destacando aqueles que apresentaram um efeito supressivo da parasitemia, mas incapazes de curar como o quinoleínico “Bayer 7.602”, as aminoquinolinas, os arsênicos trivalentes (também conhecido como spirotrypan), os nitrofuranos e os antibióticos.

No Brasil, na década de 70, foi comercializado o primeiro fármaco para o combate da doença, nifurtimox (Lampit®), um derivado nitrofurano que age causando dano oxidativo por meio da formação de radicais livres. Posteriormente, foi divulgado e liberado para uso terapêutico na América Latina, o benznidazol (Rochagan®) que forma ligação covalente e outras interações de nitrorredução entre os intermediários de benznidazol e as macromoléculas do parasita (SÁNCHEZ-SANCHO *et al.*, 2010). Além de ambos compostos serem efetivos somente na fase aguda, provocam diversos efeitos adversos. O nifurtimox apresenta efeitos como leucopenia, anemia hemolítica; e o benznidazol provoca fraqueza muscular, dor articular, parestesia, prurido, rash cutâneo e outros mais (MICROMEDEX, 2015). Portanto, ainda não há um tratamento ideal para esta enfermidade, de forma que todos os esforços são necessários na busca de uma terapêutica eficaz.

Novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm sido desenvolvidos por pesquisadores como os pró-fármacos dipeptídicos de primaquina (PQ), sintetizados por Chung e colaboradores em 1997, a fim de reduzir a hematotoxicidade através da redução da oscilação da concentração plasmática. Também, Menezes e colaboradores (2015) sintetizaram o composto diarildiazepinos

que foi capaz de reduzir a proliferação do epimastigota e apresentou um IC<sub>50</sub> de 0,25 µM, sendo significativamente mais potente que o BNZ.

Neste contexto, Caputto et al. (2012) sintetizou e avaliou os derivados de tiazolilhidrazonas (TZH), planejados por Finkielsteine e colaboradores da Universidade de Buenos Aires, como agentes anti-*T. cruzi* e relatou que alguns compostos são mais seletivos e potentes do que o fármaco de referência, benznidazol (BNZ).

O ensaio de citotoxicidade inespecífica comprovou a seletividade já que, em uma concentração de 100 µM, nenhum dos dezessete derivados causou morte celular, diferente do BNZ que, em uma concentração de 82,79 µM, causou 50% de morte nas células (CAPUTTO, 2012).

O ensaio da atividade anti-*T. cruzi* confirmou que os fármacos são ativos, para as diferentes formas do parasita. O TZH-9 (**figura 1**), objeto desse projeto, apresentou IC<sub>50</sub> de 4,53±0,66 µM contra 5,39±0,25 µM do benznidazol em epimastigotas e 20,01±1,99 µM contra 30,26±2,85 µM do benznidazol em tripomastigota. No ensaio em formas amastigotas, o TZH-9 foi o mais ativo, com IC<sub>50</sub> de 0,09±0,02 µM (CAPUTTO, 2012).

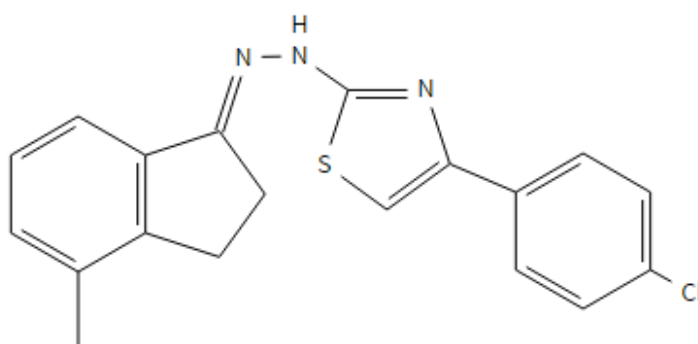


Figura 1 - Estrutura molecular do tiazolilhidrazona -9 (TZH-9)

A partir dos ensaios realizados, nota-se que a molécula TZH-9 teve a melhor correlação de atividade contra as três formas do protozoário (CAPUTTO, 2012), tornando-a uma excelente candidata a continuidade de estudos na fase de desenvolvimento, como os ensaios de farmacocinética e metabolismo.

Em etapa anterior ao ensaio de farmacocinética, é preciso desenvolver um método bioanalítico. O desenvolvimento de métodos bioanalíticos e a aplicação da farmacocinética estabeleceram um relacionamento sinérgico que desempenha um papel vital e influente na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A utilização do sistema UPLC para desenvolver um método bioanalítico permite determinar, de modo rápido e fácil, as condições ideais para separar e quantificar analitos de interesse da matriz biológica (AYRTON, 2008).

O preparo da matriz biológica também é um ponto fundamental do método bioanalítico e tem como função remover proteínas que podem contaminar a coluna de cromatografia; eliminar compostos endógenos interferentes; e promover concentração da amostra para aumentar a sensibilidade do ensaio. As técnicas mais comuns são precipitação de proteínas com ácido, sais ou solventes orgânicos; extração líquido-líquido; e extração em fase sólida (FIGUEIREDO, 2013).

Por fim, farmacocinética é aplicada para determinação de parâmetros farmacocinéticos, como *clearance*, volume de distribuição, meia-vida de eliminação e biodisponibilidade em estudos pré-clínicos e clínicos de fase 1 (AYRTON, 2008).

Portanto, inicialmente, é necessário desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar o TZH-9 em plasma de ratos e de humanos e avaliar a estabilidade de TZH-9 nessas matrizes, sendo esses os objetivos do presente trabalho.



## 2. Objetivos

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar o TZH-9 em plasma de ratos e de humanos.
- Avaliar a estabilidade de TZH-9 em plasma (*ex vivo*) de ratos e de humanos.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica

O tiazolilhidrazona-9 (TZH-9) foi sintetizado e cedido pelo laboratório de Química Medicinal do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia-Bioquímica da Universidade de Buenos Aires. O TZH-9 foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo da solução estoque em acetonitrila na concentração de 100 µg/mL. A daunorrubicina foi utilizado como padrão interno (PI) solubilizado em metanol na concentração de 100 µg/mL e adquirido da Pfizer® (Brasil).

O solvente acetato de etila utilizado para extração líquido-líquido no procedimento bioanalítico foi comprado da Macron Chemicals (USA). O solvente acetonitrila empregado na fase móvel do sistema cromatográfico e utilizado no procedimento bioanalítico foram obtidos da J.T.Baker (México), grau HPLC. O sulfato de amônio (P.A) utilizado como solução saturada para precipitação de proteínas no procedimento bioanalítico foi adquirido da Reagen (Brasil).

O plasma utilizado como matriz biológica foi obtido de ratos wistar e de humanos saudáveis. Os plasmas foram armazenados e congelados a -10°C até o uso por no mínimo 8h.

#### 3.1.2. Equipamentos

- UPLC Acquity®, Waters;

- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, Odontobrás;
- Vórtex AP56, Phoenix;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;
- Evaporador à vácuo, miVac Duo Concentrator, Genevac.

### **3.1.3. Softwares**

- Empower 3, Waters®
- Graphpad Prism® versão 5.0

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Desenvolvimento do método bioanalítico**

#### **3.2.1.1. Espectro de absorção**

A varredura permite caracterizar qual a faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) em que o TZH-9 apresenta maior intensidade de absorção. Foi utilizado um espectrofotômetro BioTek®-PowerWave HT em que foi inserida uma amostra da solução de TZH-9 de 10  $\mu\text{g/mL}$  preparada em acetonitrila.

#### **3.2.1.2. Sistema cromatográfico**

Para o desenvolvimento do método bioanalítico para determinar TZH-9 em plasma de humanos e ratos utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters Acquity®, equipado com detector UV-VIS-FLR, operando em modo *dual channel* nos comprimentos de onda de 262 e 331nm. Durante o desenvolvimento do método, o composto foi separado em coluna analítica de fase reversa HSS C18 SB, 1.8 $\mu\text{m}$ , 2,1x50mm com pré-coluna HSS C18, 1.8  $\mu\text{m}$  (Waters, EUA). A fase móvel foi constituída por Água:Acetonitrila (20:80), em modo isocrático e um fluxo de 0,55 mL/min. O volume de cada injeção foi de 2 $\mu\text{L}$ . A daunorrubicina

(PI) foi detectada com o detector de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 560 nm.

Após definir o método de extração, a coluna analítica utilizada foi substituída por outra coluna analítica com as mesmas características anteriores, mas com tamanho de 100 mm de comprimento para garantir melhor separação dos picos.

### **3.2.1.3. Preparo da amostra**

#### **Precipitação de proteínas com acetonitrila**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 100 µL de acetonitrila e, em seguida, a mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. O sobrenadante foi filtrado e injeto no sistema UPLC.

#### **Extração com acetato de etila**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 300 µL da amostra, foi acrescentado 1000 µL de acetato de etila e, em seguida, a mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 600 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 20 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspensionado em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

#### **Extração com acetato de etila em meio ácido**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo

contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 50 µL ácido tricloroacético (TCA) 10% e 1000 µL de acetato de etila. Em seguida, a mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 600 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 20 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspendido em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

#### **Extração com acetato de etila em meio básico**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 1,0 µg/mL e 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 50 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M e 1000 µL de acetato de etila. Em seguida, a amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 600 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 20 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspendido em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

#### **Extração com hexano**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 1,0 µg/mL e 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 500 µL de hexano, sendo agitado e deixado em repouso por 5 minutos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 300 µL da fase orgânica foram recolhidos e o processo foi repetido por mais duas vezes. Toda a fase orgânica recolhida foi evaporada por 10

minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspensa em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

#### **Extração com acetato de etila e hexano**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 300 µL de acetato de etila, sendo agitado e deixado em centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase orgânica, 150 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 10 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspensa com 500 µL hexano e 500 µL água. A amostra foi agitada, colocada em banho de ultrassom por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. A fase orgânica foi recolhida e evaporada por 5 minutos no evaporador à vácuo. Em seguida, foi ressuspensa em 100 µL de acetonitrila, filtrada e injetada no sistema UPLC.

#### **Extração com mistura de hexano e acetato de etila (70:30)**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 500 µL da mistura de hexano e acetato de etila (70:30), sendo agitado e deixado em repouso por 5 minutos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 300 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 10 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspensa em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

### **Extração com acetonitrila e hexano**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 10 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 100 µL da amostra, foi acrescentado 100 µL de acetonitrila, sendo agitado e centrifugado por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Em seguida, adicionou 500 µL hexano, agitou e colocou no banho de ultrassom por 5 minutos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 300 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados por 25 minutos no evaporador à vácuo, sendo ressuspendido em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

### **Extração com solução de sulfato de zinco saturada e acetato de etila**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 200 µL da amostra, foi acrescentado 100 µL de solução saturada de sulfato de zinco. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 500µL de acetato de etila, sendo agitada e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 450 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados em rotavapor por 15 minutos e foi ressuspendido em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

### **Extração com solução de sulfato de amônio saturada e acetato de etila**

O plasma isento de analito foi adicionado de solução de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal de 3,0 µg/mL e 8,0 µg/mL em acetonitrila. Em um microtubo contendo 200 µL da amostra, foi acrescentado 100 µL de solução

saturada de sulfato de amônio. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1000 µL de acetato de etila, sendo agitada e centrifugada por 10 minutos a 14000 x g sob a temperatura de 25°C. Com a separação da fase aquosa e orgânica, 900 µL da fase orgânica foram recolhidos e evaporados em rotavapor por 50 minutos e foi ressuspensionado em 100 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada e injetada no sistema UPLC.

### **3.2.2. Validação do método bioanalítico**

A validação assegura que os procedimentos utilizados no método bioanalítico desenvolvido atenda os limites de confiança estabelecidos. Esta avaliação foi fundamentada nas normas da ANVISA de acordo com as resoluções 899/2003 e 27/2012. Os parâmetros determinados foram: seletividade, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão, e estabilidade de armazenamento.

- *Seletividade*

A seletividade é a capacidade do método de quantificar substância de interesse sem a interferência de componentes endógenos comuns a matriz biológica escolhida. Para isso, realizou-se três análises de amostras branco e comparou-se tais amostras com solução de TZH-9 de 8,0 µg/mL. Desse modo, não deve haver picos interferentes no tempo de retenção do fármaco.

- *Linearidade*

A curva analítica foi construída para o TZH-9 plotando-se a razão da área do pico do composto e do padrão interno (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto (250 a 8000 ng/mL). Os critérios de aceitação da linearidade incluem um coeficiente de correlação acima de 0,98 e exatidão de 85% a

115%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual a exatidão deve estar entre 80% e 120%.

- *Limite inferior de quantificação (LIQ)*

Expressa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão de 80-120% e precisão de 0-20%, com no mínimo 5 replicatas.

- *Efeito residual*

O ensaio de efeito residual analisa a ocorrência de contaminações de uma injeção de amostra para outra. Consiste de analisar uma amostra branco seguida de uma amostra do maior ponto da linearidade e novamente se analisa a amostra branco mais duas vezes. Deve ser observado se há picos interferentes no tempo de retenção do analito, que seja superior a 20% da resposta do analito, e do padrão interno, que seja 5% superior a resposta do padrão interno.

- *Precisão e Exatidão*

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra-corridas e inter-corridas para cada um dos compostos. Os resultados intra-corridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas as determinações foram feitas em dois dias consecutivos. Os critérios de aceitação foram precisão de 0-15% e exatidão de 85-115%.

- *Estabilidade de armazenamento*

A estabilidade avalia se a concentração do analito permanece dentro dos limites estabelecidos após um período determinado e sob condições específicas. Os



ensaios de estabilidade realizados foram: estabilidade de curta duração (temperatura ambiente) por 6 horas, estabilidade de pós-processamento (10°C) por 4 horas, estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento a -10°C e estabilidade de longa duração a -10°C por 20 dias.

O ensaio é realizado nas concentrações do CQB e CQA em triplicata. Os compostos são considerados estáveis quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém preparadas.

### **3.2.3. Determinação da estabilidade *ex vivo* do TZH-9 em plasma de ratos e humanos**

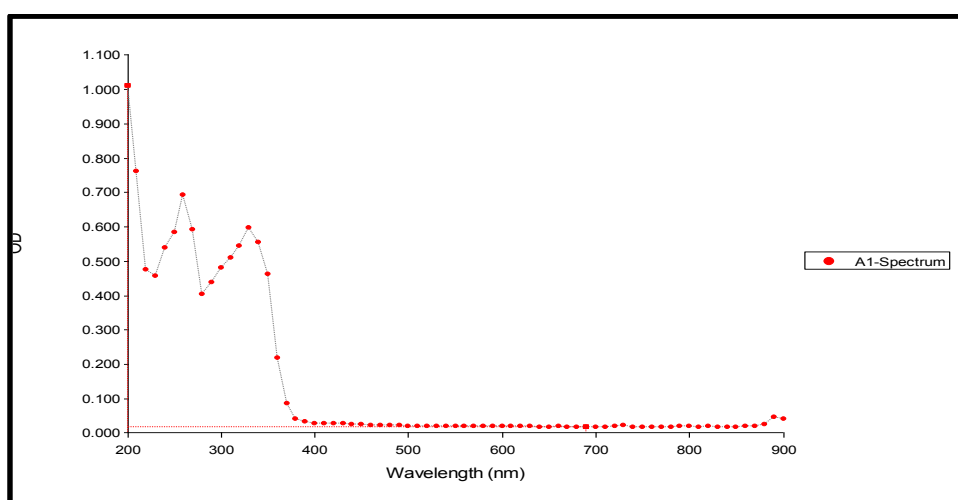
O plasma isento de analito foi adicionado de solução estoque de TZH-9 suficiente para produzir uma concentração nominal em plasma de 1500 ng/mL e 6000 ng/mL. Essa mistura foi mantida em agitação, por agitador magnético, e temperatura de 37°C, por manta aquecedora, constantes até o fim do experimento. Nos tempos de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8 e 24 horas, alíquotas de 0,2 mL foram coletadas e analisadas para determinar se o fármaco é susceptível a ação da matriz biológica. O ensaio foi realizado em triplicata em plasma de ratos e de humanos.

As concentrações do tempo inicial foram consideradas como 100% para os cálculos de decaimento. As porcentagens de decaimento foram analisadas pelo GraphPad Prism®, que indica os pontos diferentes estatisticamente. O decaimento igual ou superior a 15%, estatisticamente diferente, é considerado como o critério de aceitação para definir instabilidade.

## 4. Resultados

### 4.1 Espectro de Absorção

Na **figura 2** está demonstrado que há duas regiões da faixa de comprimentos de onda onde a molécula exibe picos de absorbância. O composto apresenta absorbância mais intensa nos comprimentos de 262nm e 331nm e isto possibilitou selecionar as melhores regiões para detecção em UV/VIS no UPLC Acquity® da Waters.



*Figura 2 - Espectro de absorção do TZH-9 nos comprimentos de onda de 200 a 900nm.*

### 4.2. Sistema Cromatográfico

Uma solução de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL foi injetada para determinar o tempo de retenção do composto e visualizar as diferenças nas dimensões dos picos nos diferentes comprimentos de onda, como está demonstrado na **figura 3**. O cromatograma em vermelho representa a solução de TZH-9 de 10 µg/mL com detecção em 331nm e o cromatograma verde representa a mesma solução com detecção em 262nm. Em 331nm, o tempo de retenção é de 0,755s e a área é 25958 unidades de área. Em 262nm, o tempo de retenção é de 0,748s e a área é 37429 unidades de área. Para o desenvolvimento do método foi utilizado dois

comprimentos de onda, afim de observar qual seria o mais adequado para detecção do fármaco em plasma.

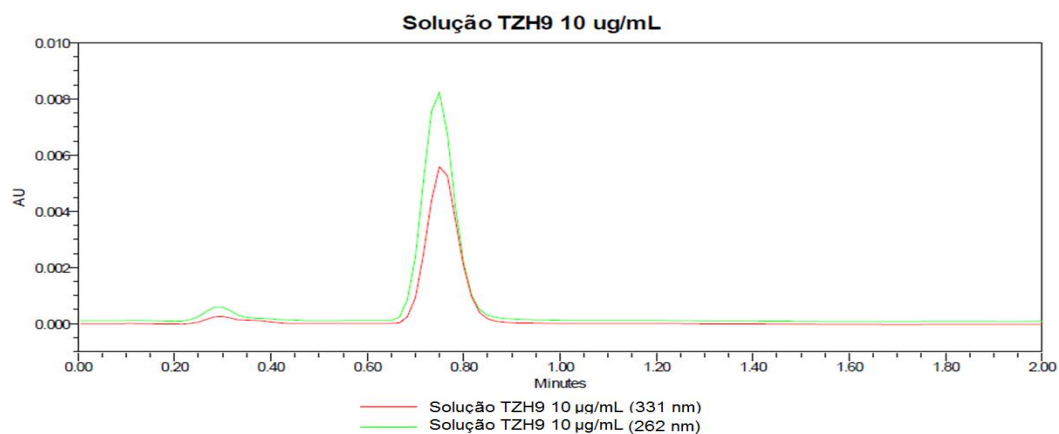


Figura 3 - Cromatogramas da solução de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL nos comprimentos de onda de 262 e 331nm.

### 4.3. Desenvolvimento do método bioanalítico

#### 4.3.1. Precipitação de proteínas com acetonitrila

A extração por precipitação com acetonitrila apresentou área baixa de TZH-9, estabelecendo um limite de detecção alto, desta forma, seu uso para extrações de amostras com concentrações menores foi impossibilitado. Porém, a extração foi capaz de eliminar os interferentes do plasma no tempo de retenção do fármaco, garantindo seletividade para o método. Na **figura 4** estão demonstrados os picos das replicatas sobrepostos na concentração de 10 µg/mL apresentando áreas de 1555, 3327 e 3580 e tempo de retenção de 0,814 segundos. Na **figura 5** está representada uma aproximação dos cromatogramas sobrepostos para demonstrar a ausência de picos interferentes das amostras branco no tempo de retenção do TZH-9.

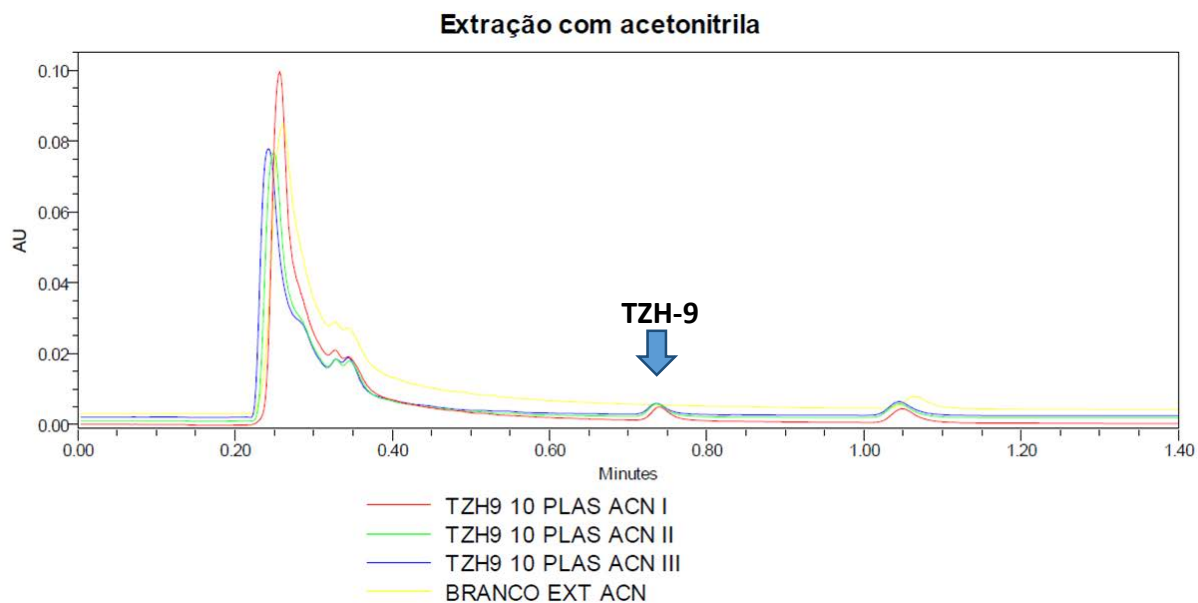


Figura 4 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  com acetoneitrila no comprimento de onda de  $331\text{nm}$ .

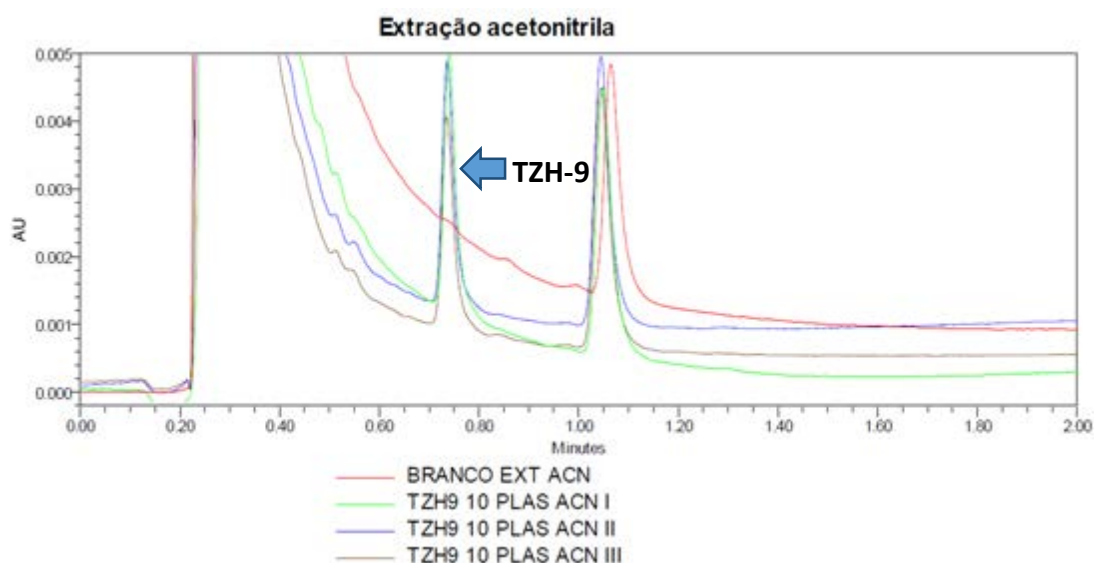
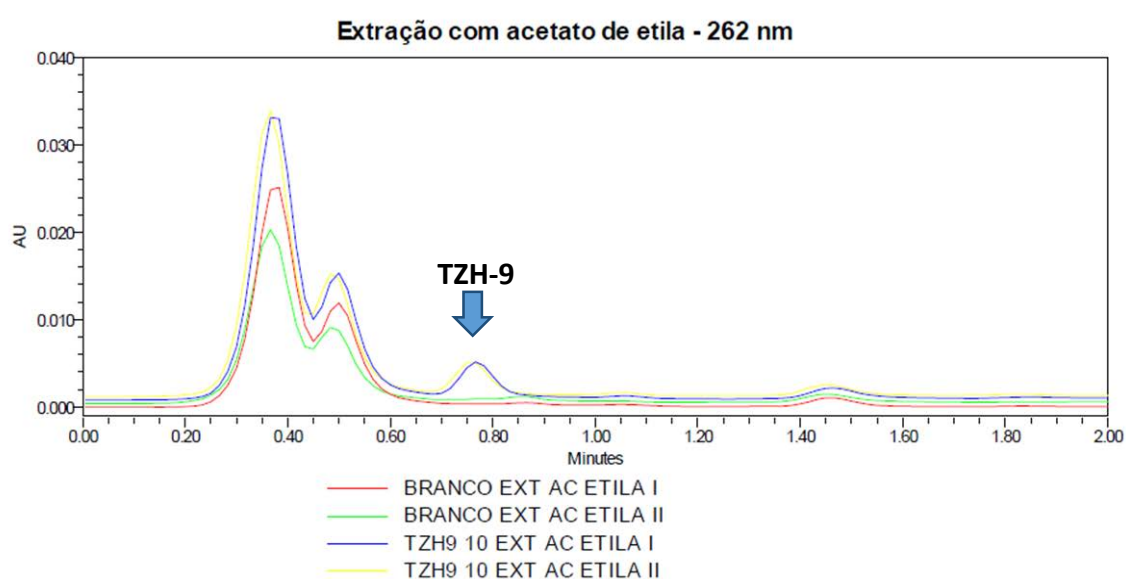


Figura 5 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  com acetoneitrila no comprimento de onda de  $331\text{nm}$ .

#### 4.3.2. Extração com acetato de etila

A extração com acetato de etila proporcionou uma área de TZH-9 maior quando comparado com a extração com acetoneitrila, entretanto, não foi suficiente para detectar áreas de amostras com o fármaco em concentrações menores, devido ao alto limite de detecção do método. A extração também não conseguiu eliminar todos os picos interferentes existentes próximos ao tempo de retenção do TZH-9. Na

**figura 6** estão representados os cromatogramas sobrepostos das amostras branco e das amostras de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL no comprimento de onda de 262nm. As áreas dos picos do TZH-9 são de 15903, 16750 e tempo de retenção de 0,760 segundos. Na **figura 7** está representada uma aproximação dos cromatogramas sobrepostos para demonstrar a presença de picos interferentes (circulados) das amostras branco no tempo de retenção do TZH-9 com área de 1800 unidades de área no comprimento de onda de 262nm. Na **figura 8** e na **figura 9** estão representados os cromatogramas das mesmas amostras utilizadas na figura 6 e 7, diferindo-se somente pela utilização do comprimento de onda em 331nm. No comprimento de onda de 331nm, os picos do plasma estão em menor quantidade e intensidade, o que proporciona um cromatograma mais limpo. As áreas dos picos do TZH-9 são de 12184, 12916 e tempo de retenção de 0,767 segundos. Na **figura 9** está representada uma aproximação dos cromatogramas sobrepostos para demonstrar a presença de picos interferentes (circulados) das amostras branco no tempo de retenção do TZH-9 com área de 431 unidades de área no comprimento de onda de 331nm.



*Figura 6 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10µg/mL com acetato de etila no comprimento de onda de 262nm.*

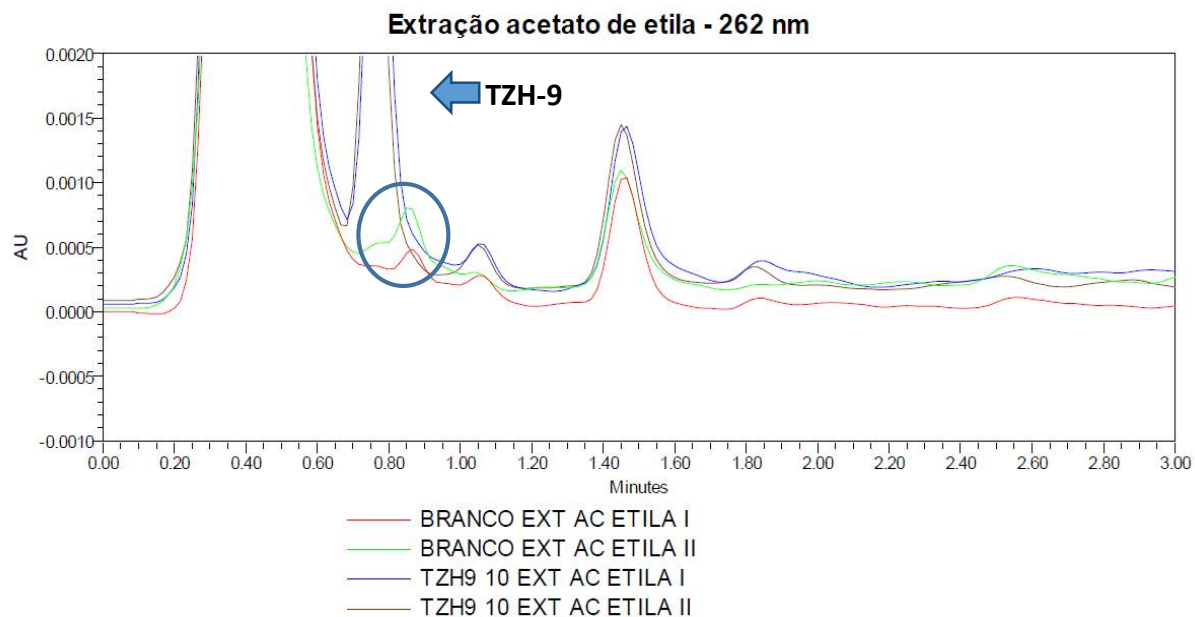


Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila no comprimento de onda de  $262\text{nm}$ . Círculo: indica a presença dos picos interferentes no tempo de retenção do TZH-9.

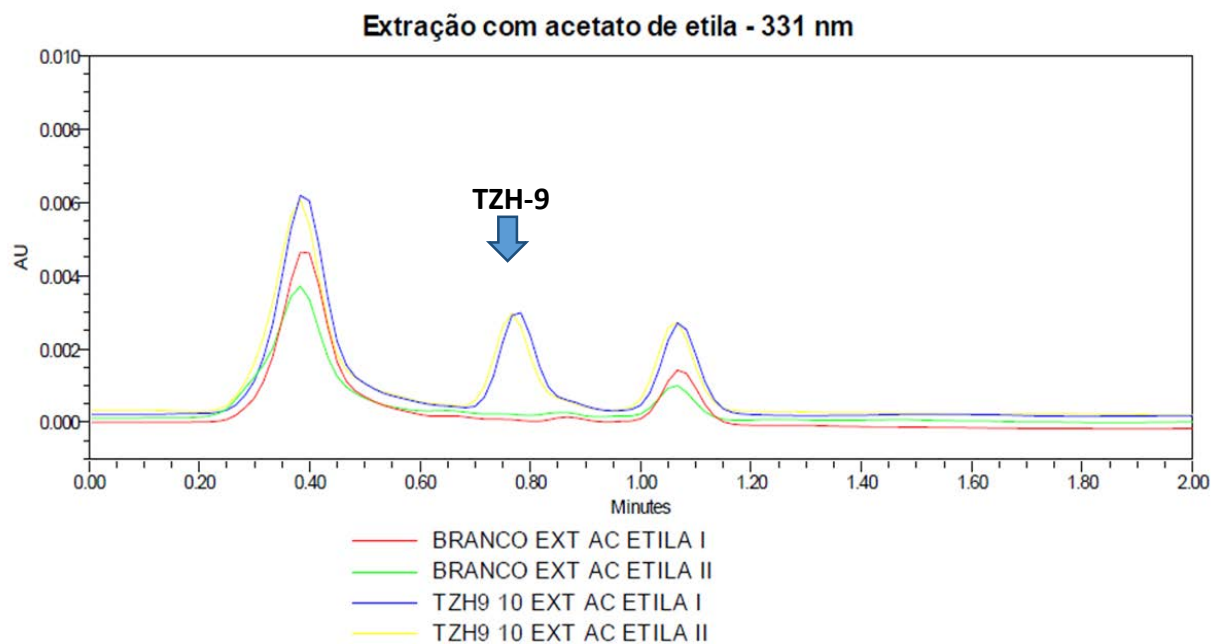


Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila no comprimento de onda de  $331\text{nm}$ .

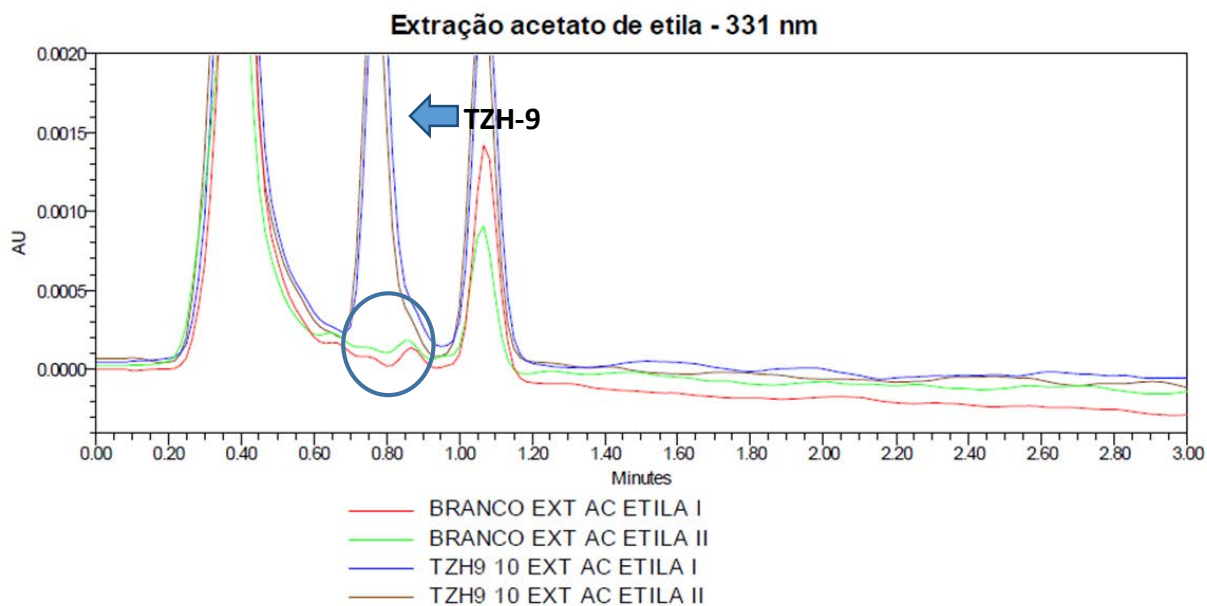


Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos aproximados da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila no comprimento de onda de 331nm. Círculo: indica a presença dos picos interferentes no tempo de retenção do TZH-9.

#### 4.3.3. Extração com acetato de etila em meio ácido

A extração com acetato de etila em meio ácido diminuiu a área do TZH-9 quando comparada com a extração feita somente com acetato de etila e gerou um cromatograma com grande quantidade de interferentes. Apesar de não haver uma amostra branco para averiguar a presença de picos do plasma no tempo de retenção do fármaco, a área do TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  foi muito baixa, apresentando valor de área de 3327, 3580, 3471, sendo inferiores às obtidas nas outras extrações, e tempo de retenção de 0,814 segundos como está mostrando a **figura 10**.

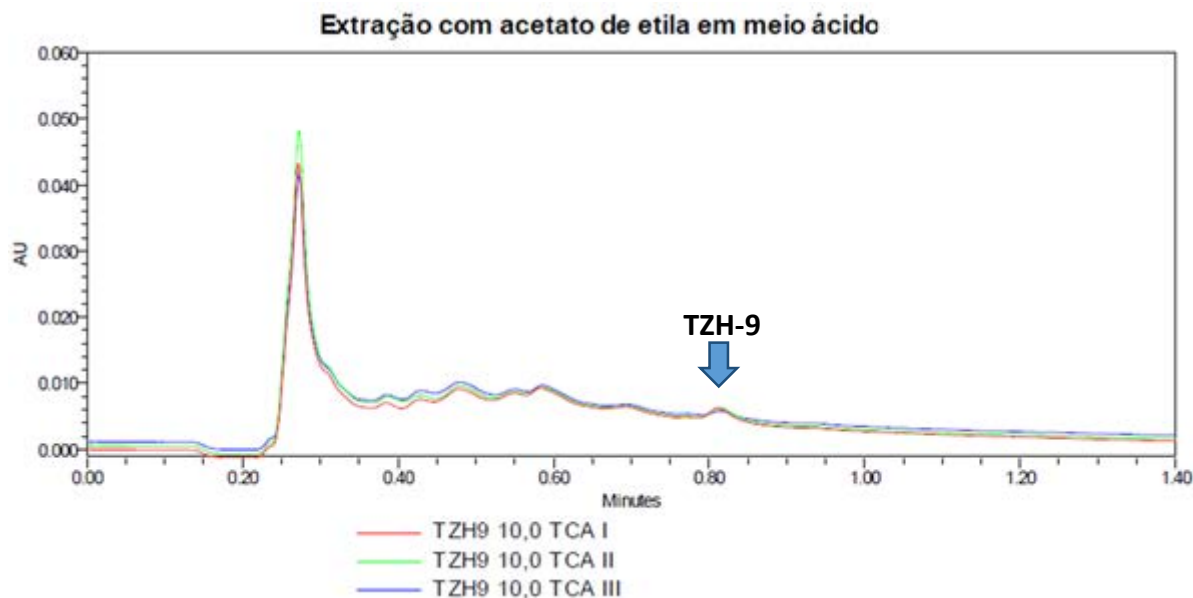


Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila em meio ácido no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.4. Extração com acetato de etila em meio básico

A extração com acetato de etila em meio básico também gerou cromatograma com linha de base com grande quantidade de interferentes e diminuiu a área do TZH-9 quando comparada com a extração somente com acetato de etila. Apesar de não haver uma amostra branco para demonstrar a presença de picos do plasma no tempo de retenção do fármaco, a área do TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  foi muito baixa, apresentando valor de área de 4141, 4357, 4471, sendo inferiores às obtidas nas outras extrações, e tempo de retenção de 0,816 segundos como está mostrando a **figura 11**.



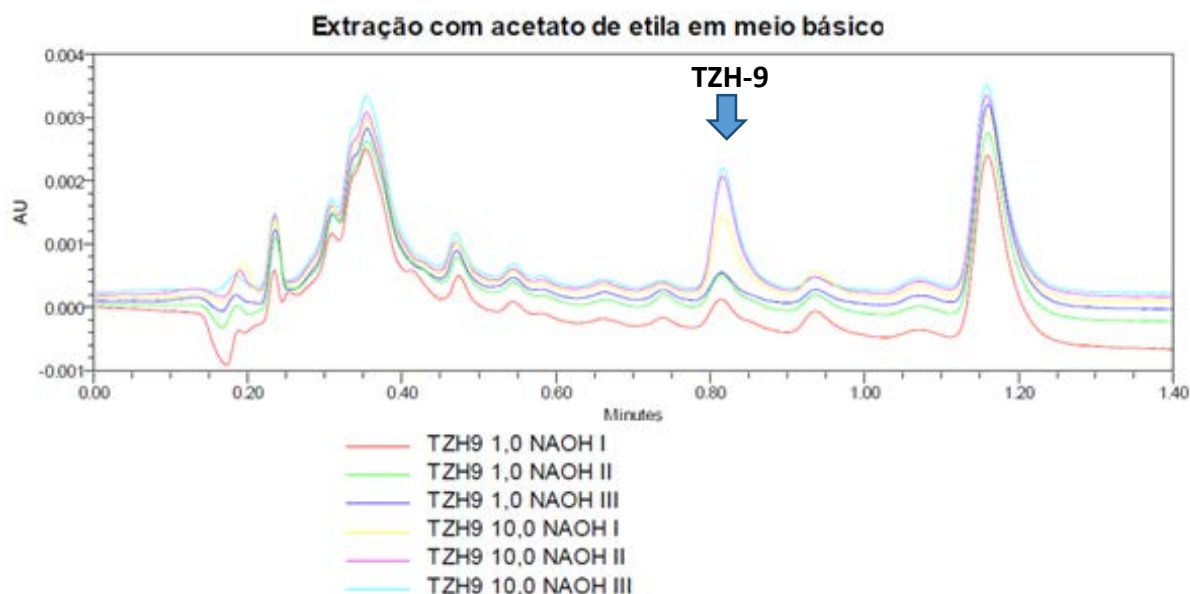


Figura 11 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila em meio ácido no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.5. Extração com hexano

A extração com hexano produziu um cromatograma com linha de base com grande quantidade de interferentes e não foi capaz de extrair suficientemente o TZH-9 do plasma. Na **figura 12**, o fármaco extraído não foi bem separado dos picos de plasma no comprimento de onda de 262nm. Na **figura 13**, utilizando detecção em 331nm, os picos apresentam melhor resolução, contudo, não foi possível extrair as amostras de concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e teve baixa recuperação das concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

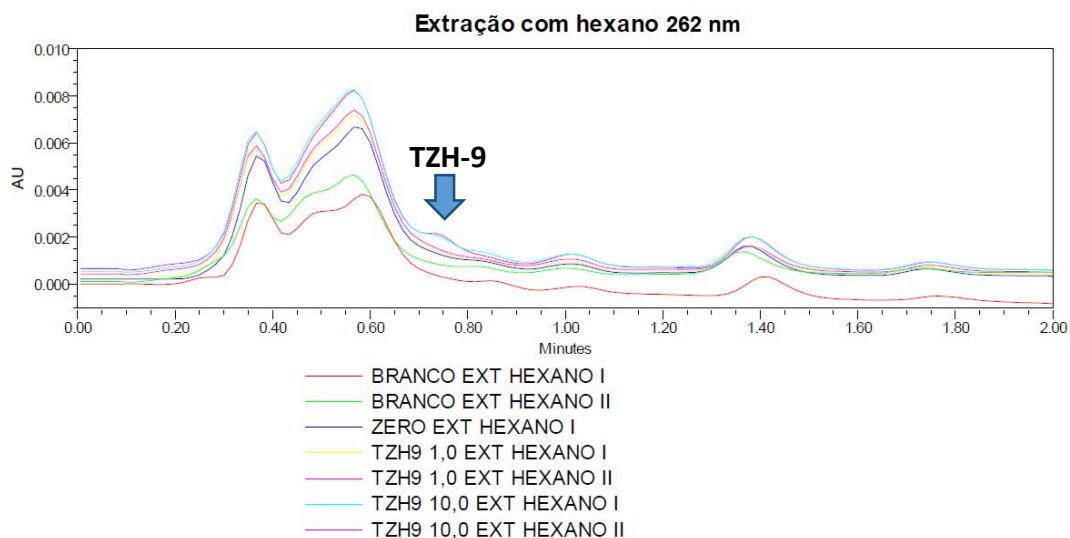


Figura 12 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com hexano no comprimento de onda de 262nm.

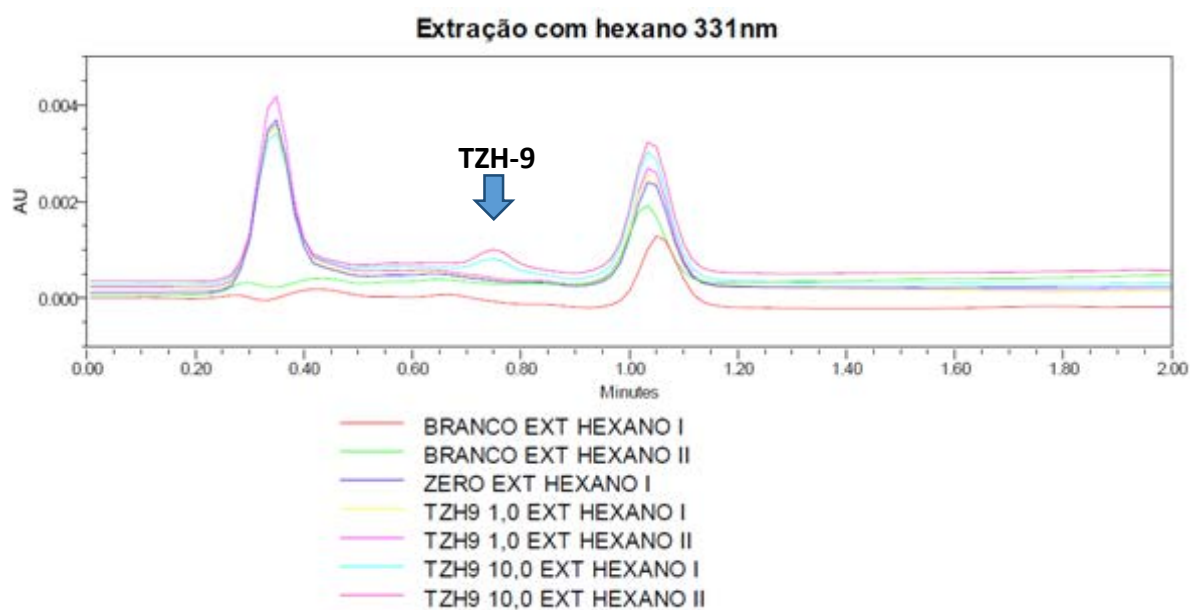


Figura 13 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com hexano no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.6. Extração com acetato de etila e hexano

A extração com acetato de etila e hexano teve proporcionou uma área baixa de TZH-9 como está indicado na figura 14 e 15. Na **figura 14**, a detecção foi feita no comprimento de onda de 262nm e demonstrando que não houve boa separação dos picos. Na **figura 15**, a detecção foi feita no comprimento de onda de 331nm e

mostra uma separação melhor dos picos, melhorando sua resolução, mas ainda não foi suficiente para estabelecer um bom limite de detecção.

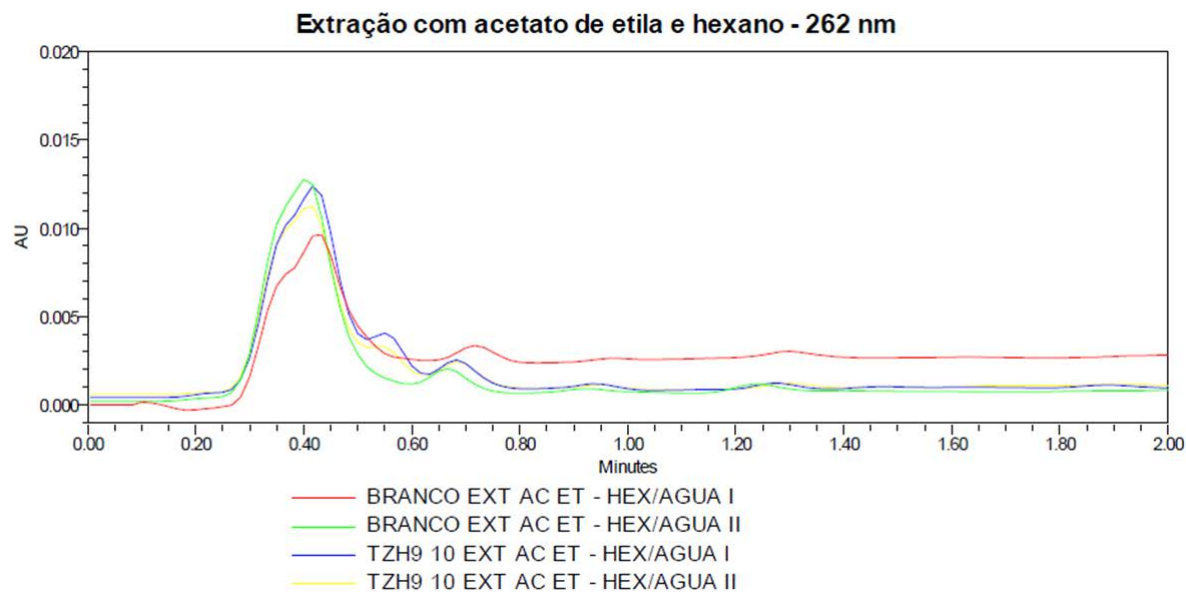


Figura 14 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila e hexano no comprimento de onda de 262nm.

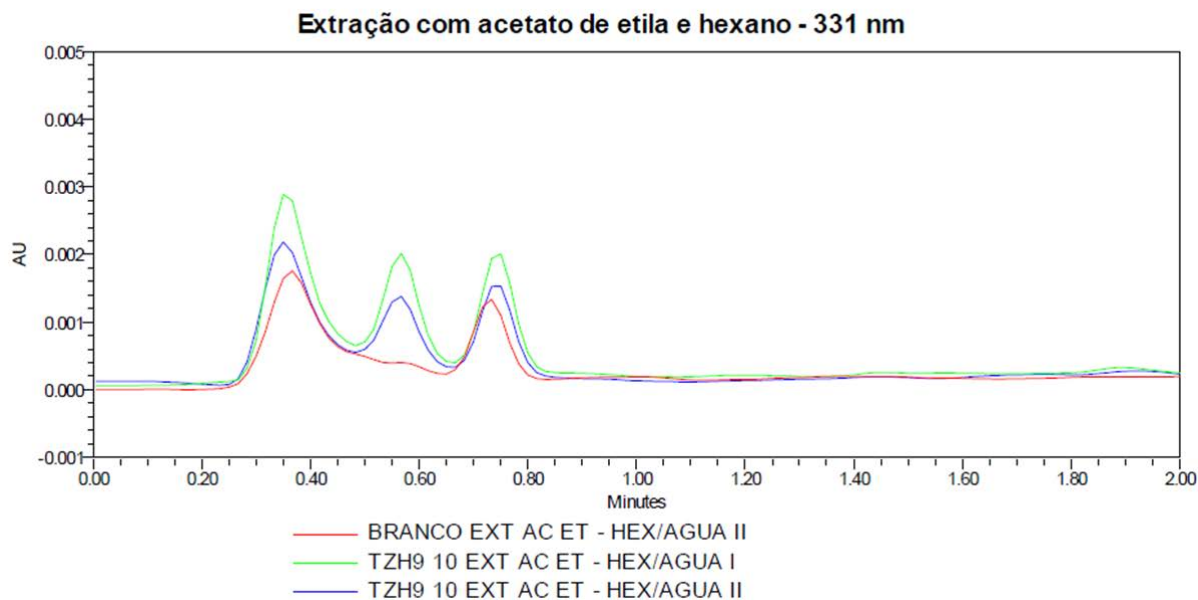


Figura 15 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  com acetato de etila e hexano no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.7. Extração com mistura de hexano e acetato de etila (70:30)

A extração com mistura de hexano e acetato de etila manteve um perfil do cromatograma muito parecido com as extrações anteriores com hexano. Nas **figuras 16 e 17**, pode-se observar baixa resolução dos picos e baixa recuperação do TZH-9, respectivamente.

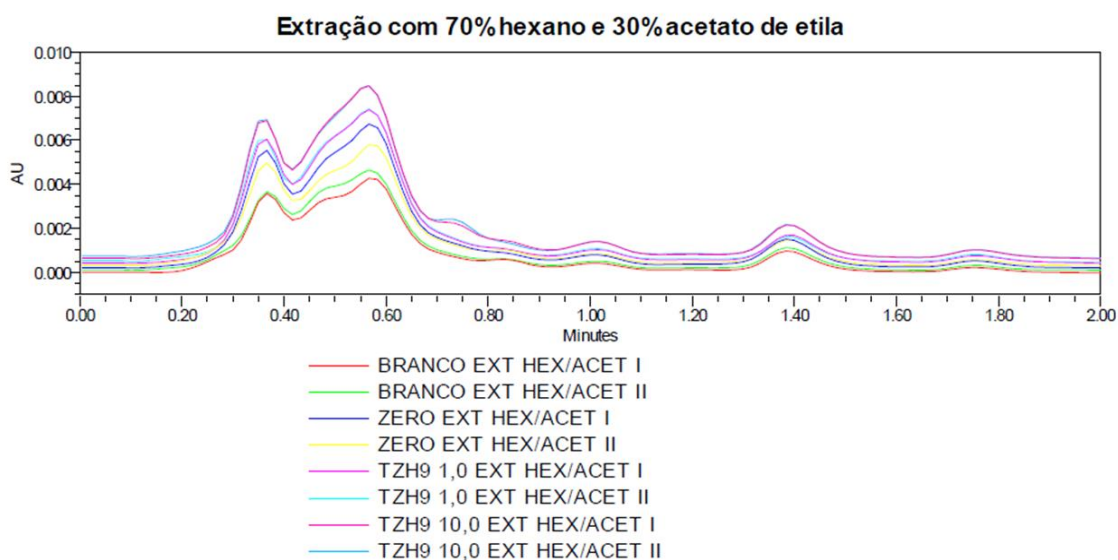


Figura 16 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com mistura de hexano e acetato de etila (70:30) no comprimento de onda de 262nm.

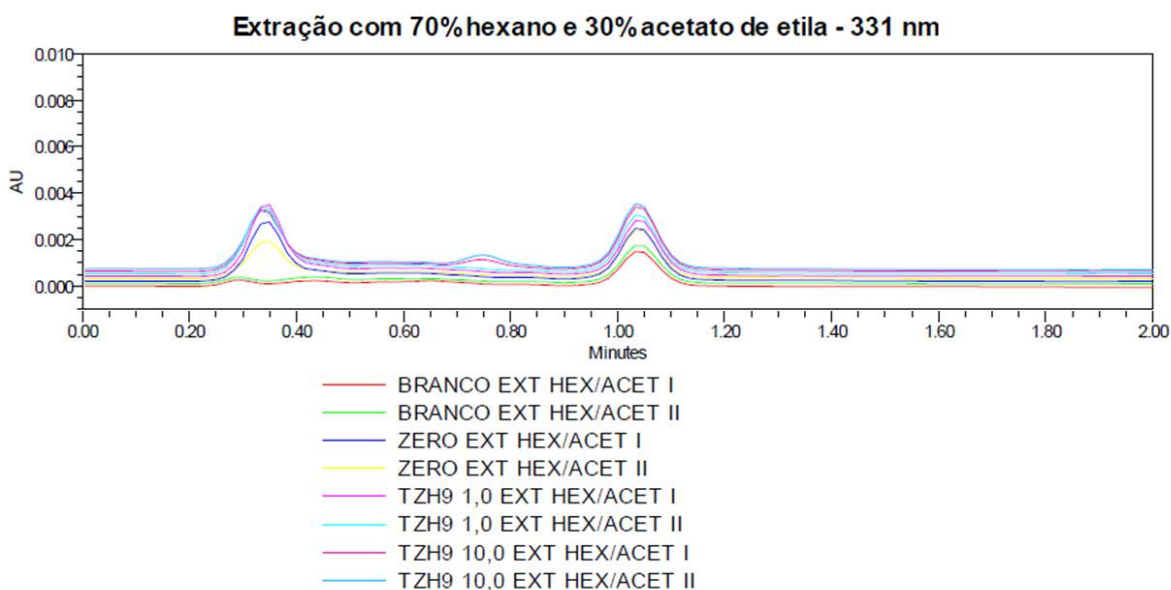


Figura 17 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com mistura de hexano e acetato de etila (70:30) no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.8. Extração com acetonitrila e hexano

A extração com acetonitrila e hexano gerou um cromatograma com linha de base com grande quantidade de interferentes e com uma área baixa de TZH-9, como demonstrado na **figura 18**.

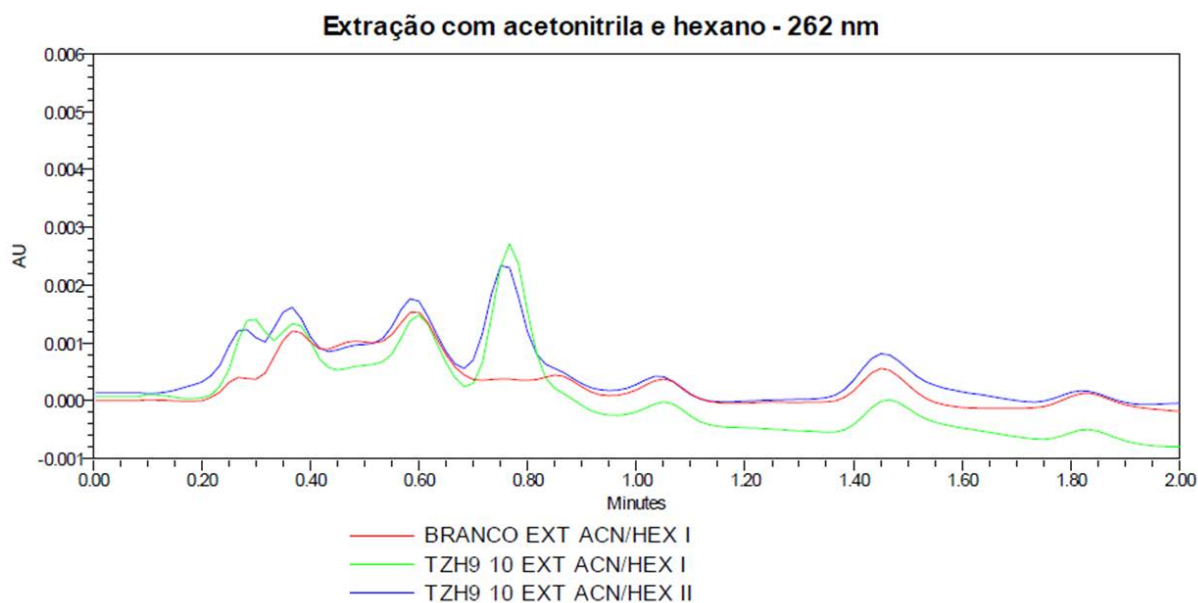


Figura 18 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 na concentração de 10 µg/mL com acetonitrila e hexano no comprimento de onda de 262nm.

#### 4.3.9. Extração com solução saturada de sulfato de zinco e acetato de etila

A extração com solução saturada de sulfato de zinco e acetato de etila produziu um cromatograma limpo e com boa recuperação e separação do analito, garantindo um limite de detecção suficientemente baixo para prosseguir para a validação, como apresentado na **figura 19**. Entretanto, apresentou um perfil de extração variável, não sendo reproduzível.

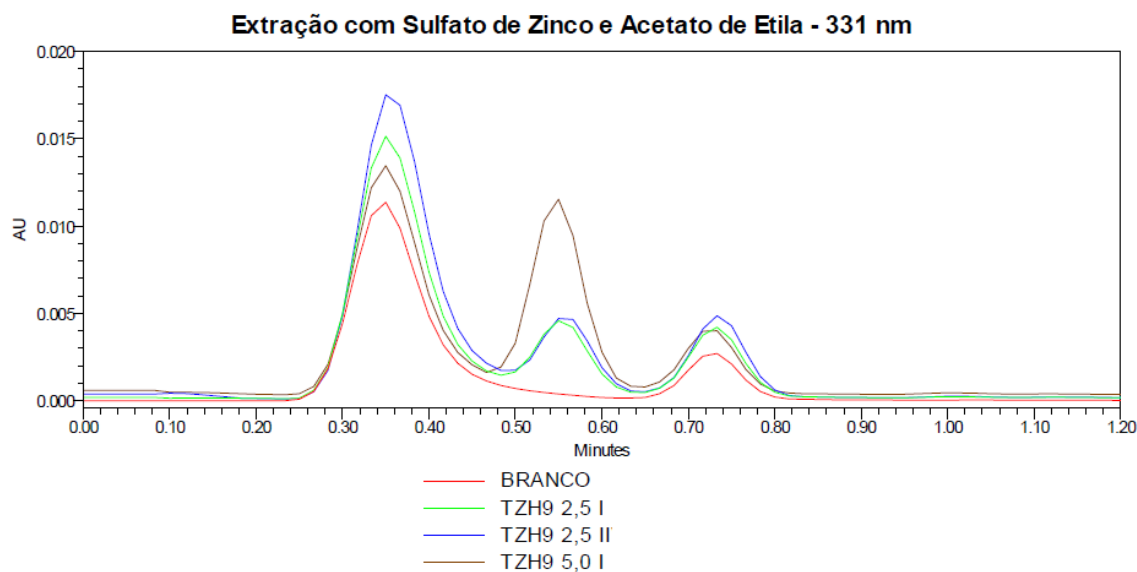
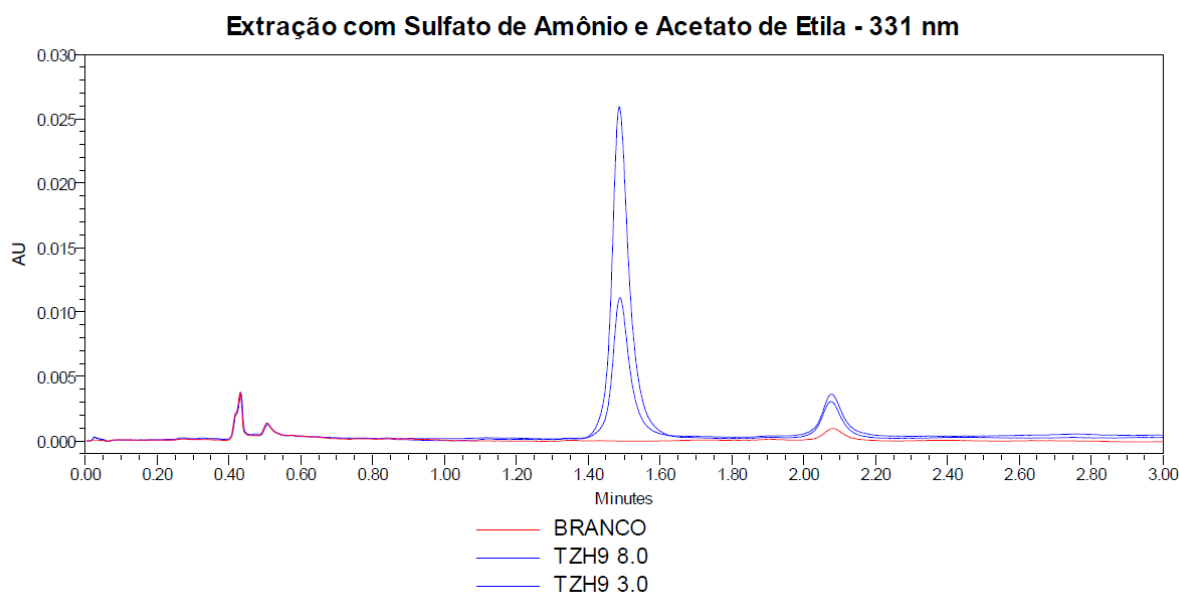


Figura 19 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  com solução saturada de sulfato de zinco e acetato de etila no comprimento de onda de 331nm.

#### 4.3.10. Extração com solução saturada de sulfato de amônio e acetato de etila

A extração com solução saturada de sulfato de amônio e acetato de etila apresentou perfil de extração semelhante à extração anterior. Produziu um cromatograma limpo, com boa recuperação e separação do analito como está apresentada na **figura 20**. Além disso, a separação do analito foi realizada em uma coluna analítica com as mesmas características, porém com 100 mm de comprimento, o que garantiu uma melhor separação dos picos. Desta forma, este foi o método mais adequado e escolhido para continuidade dos estudos.



*Figura 20 - Cromatogramas sobrepostos da extração em plasma de TZH-9 nas concentrações de 3,0 e 8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com solução saturada de sulfato de amônio e acetato de etila no comprimento de onda de 331nm.*

#### **4.4. Validação do método bioanalítico**

O método bioanalítico foi validado com a finalidade de quantificar o TZH-9 em plasma.

##### **4.4.1. Seletividade**

O ensaio de seletividade avaliou a existência de picos interferentes no tempo de retenção do TZH-9, principalmente os de origem biológica, através da análise de amostras branco e amostra extraída do analito (8000 ng/mL). O método bioanalítico mostrou-se seletivo como pode ser visto na **figura 22**, que está apresentando o pico do TZH-9 em 1,619 minutos e nenhum pico interferente (branco) no tempo de retenção. Na **figura 23**, está apresentado uma aproximação do cromatograma para demonstrar a ausência de interferentes no tempo de retenção do analito.

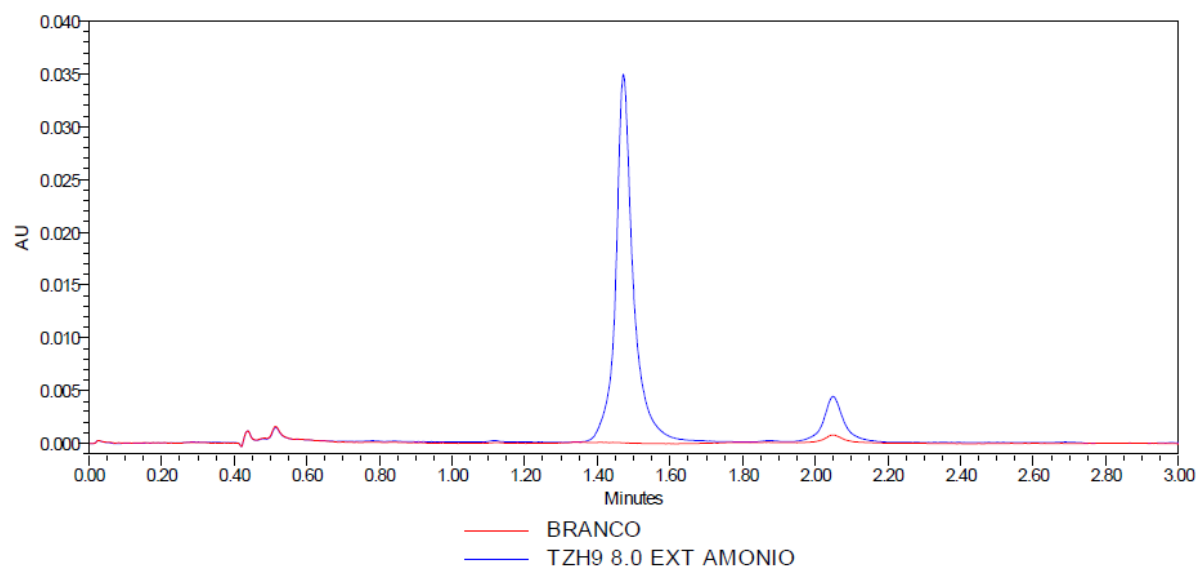


Figura 21 - Cromatograma do TZH-9 (azul) sobreposto ao cromatograma da amostra branco (vermelho), apresentando a seletividade do método.

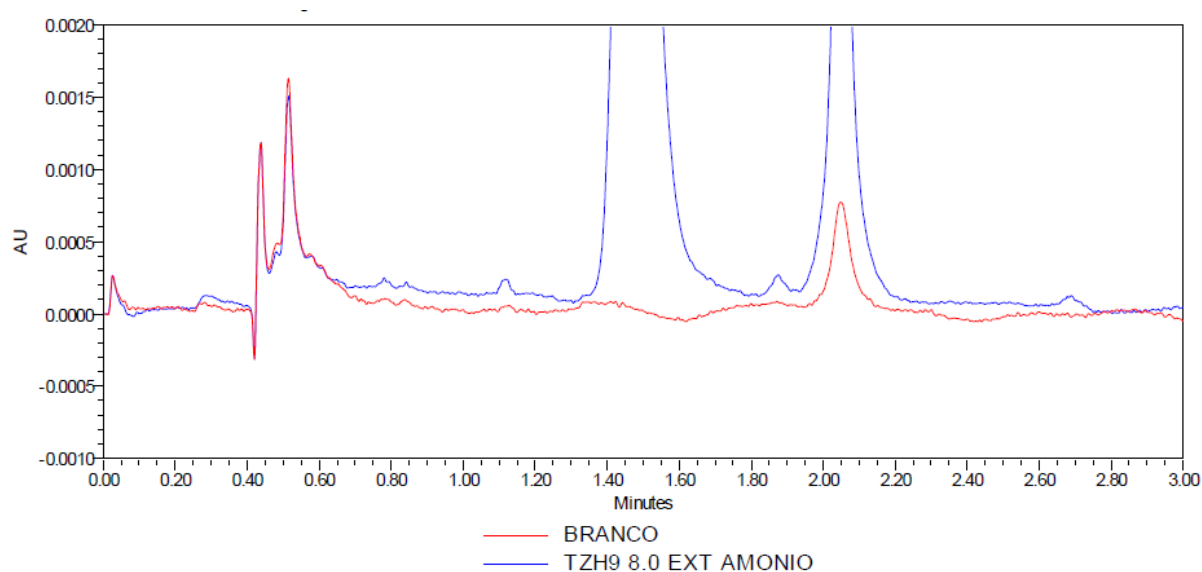


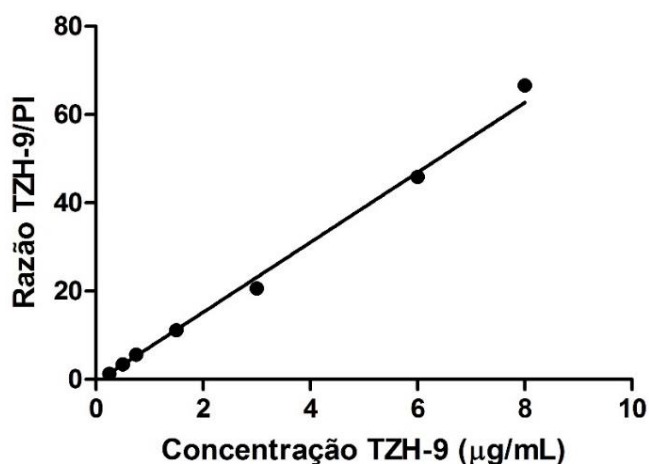
Figura 22 - Aproximação do cromatograma do TZH-9 (azul) sobreposto ao cromatograma da amostra branco (vermelho), apresentando a seletividade do método.

#### 4.4.2. Linearidade

A curva de linearidade foi construída plotando-se a razão da área do pico de TZH-9 pela área do pico do padrão interno no eixo y e valores nominais de concentração em 7 níveis de 250 a 8000 ng/mL, em quintuplicata. Assim, obtém-se a equação da linearidade que permite calcular a concentração de valores



desconhecidos do analito pela interpolação das razões de área e padrão interno na equação da reta de linearidade. A **figura 23** apresenta a curva construída com as concentrações de 250, 500, 750, 1500, 3000, 6000, 8000 ng/mL.



*Figura 23 - Curva de linearidade do TZH-9 em plasma.*

Na **tabela 1**, está representada a comparação entre as concentrações e as exatidões obtidas a partir de regressão linear e regressão não linear, justificando a necessidade do uso da regressão não linear ( $1/y^2$ ) para normalizar a tendência da reta.

Concentrações	Exatidão	
	Regressão linear	Regressão não linear ( $1/y^2$ )
0,25	129,92	98,37
0,5	116,95	103,07
0,75	113,58	105,63
1,5	101,53	99,20
3	89,20	89,43
6	95,98	97,97
8	103,51	106,16

*Tabela 1 – Comparação entre as concentrações e as exatidões obtidas a partir de regressão linear e regressão não linear ( $1/y^2$ ).*

A equação da reta foi  $y = 7,922x - 0,6392$ , obtida por ponderação ( $1/y^2$ ) e o  $r$  foi de 0,9971. A exatidão da curva de linearidade ficou entre 89,43 e 106,16; estando dentro dos critérios de aceitação. O LIQ foi de 250 ng/mL, pois foi a menor

concentração que apresentou precisão (CV %=6,15) e exatidão (98,37%) dentro dos critérios de aceitação.

#### 4.4.3. Efeito Residual

O ensaio de efeito residual não apresentou picos residuais no tempo de retenção do analito e do padrão interno.

#### 4.4.4. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio de controles de qualidade CQA (6000 ng/mL), CQM (1500 ng/mL) e CQB (500 ng/mL) de acordo com a **tabela 2**.

*Tabela 2 - Precisão e exatidão do método bioanalítico.*

		Concentração nominal (ng/mL)		
		500	1500	6000
intra-dia (n=5)	Conc. Experimental (ng/mL)	485,24	1365,44	5699,89
	Precisão (%)	7,36	13,17	12,24
	Exatidão (%)	97,05	91,03	94,99
inter-dia (n=10)	Conc. Experimental (ng/mL)	497,21	1392,63	5486,88
	Precisão (%)	10,77	11,93	12,71
	Exatidão (%)	99,44	92,84	91,45

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

Exatidão % = [concentração experimental / concentração nominal) x 100]

Os resultados da **tabela 2** encontram-se todos dentro dos limites de precisão (CV<15%) e exatidão (85-115%) propostos pelos guias de validação de métodos bioanalítico.

#### 4.4.5. Estabilidade de armazenamento

O ensaio de estabilidade de armazenamento em plasma contido na validação do método bioanalítico, tem a função de determinar em que condições as amostras que serão quantificadas podem ser estocadas. Portanto, após a coleta de uma

amostra ela deve ser armazenada em uma condição que tenha sido avaliada neste ensaio. Na **tabela 3**, estão apresentados os resultados dos ensaios de estabilidade de TZH-9 em plasma. Ainda, está demonstrada no ensaio qual condição de armazenamento deve ser evitada.

*Tabela 3 - Estabilidade de armazenamento do TZH-9.*

	CD 6h T°amb	PP 3h 10°C	CCD -10°C	LD 20 dias -10°C
500 ng/mL				
N	3	3	3	3
CV (%)	4,61	11,23	6,51	10,31
Exatidão (%)	89,51	95,0	51,16	68,70
6000 ng/mL				
N	3	3	3	3
CV (%)	2,87	10,66	5,44	7,96
Exatidão (%)	86,13	101,0967	92,80	67,27

CV %= Coeficiente de variação. CD 6h T°amb: estabilidade de curta duração após 6 horas em temperatura ambiente. PP 3h 10°C: estabilidade de pós processamento - amostras reinjetadas após 3 horas de armazenamento a 10°C. CCD -10°C: estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento a -10°C. LD 20 dias -10°C: estabilidade de longa duração por 20 dias a -10°C. Nota: descongelamento em temperatura ambiente.

Um analito é considerado estável quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém preparadas. Assim, o TZH-9 foi estável durante a estabilidade de curta duração de 6 horas e na estabilidade de pós-processamento de 3 horas. Entretanto, o analito não foi estável durante a estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento e na estabilidade de longa duração por 20 dias.

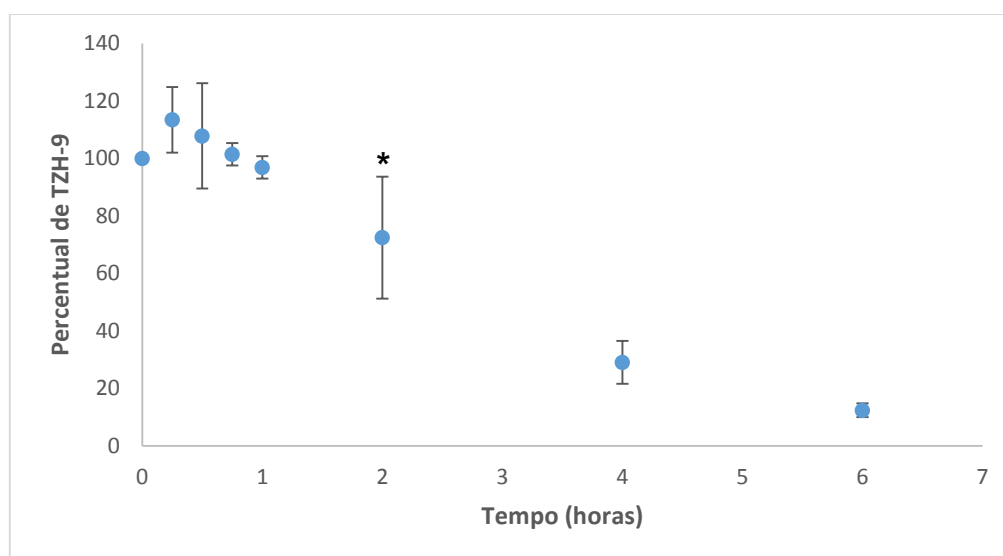
#### **4.5. Estabilidade *ex vivo* do TZH-9 em plasma de ratos e plasma de humanos**

O ensaio de estabilidade *ex vivo* do TZH-9 em plasma de ratos e humanos foi realizado para mimetizar a ação do plasma, proveniente do sangue circulante, sobre o fármaco e analisar a susceptibilidade do TZH-9 à degradação pelas enzimas plasmáticas.

Na **tabela 4** e na **figura 24** estão demonstrados os resultados do estudo de estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos na concentração de 1500 ng/mL, sob agitação e temperatura de 37°C. Houve diferença estatística significativa em relação ao tempo inicial a partir do ponto de 2 horas. O ensaio foi encerrado em 6h por atingir concentrações abaixo do limite de quantificação do método desenvolvido.

Tempo (h)	Percentual de decaimento (%)				
	I	II	III	Média	DP
0	100	100	100	100	0
0,25	119,87	120,18	100,28	113,44	11,40
0,5	128,89	99,44	95,19	107,84	18,35
0,75	105,83	100,32	98,30	101,49	3,90
1	101,28	95,57	93,82	96,89	3,90
2	91,85	75,69	49,83	72,45*	21,19
4	36,61	28,94	21,72	29,09	7,45
6	14,73	12,56	9,91	12,4	2,41

*Tabela 4 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de ratos na concentração de 1500 ng/mL. \*Apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey).*

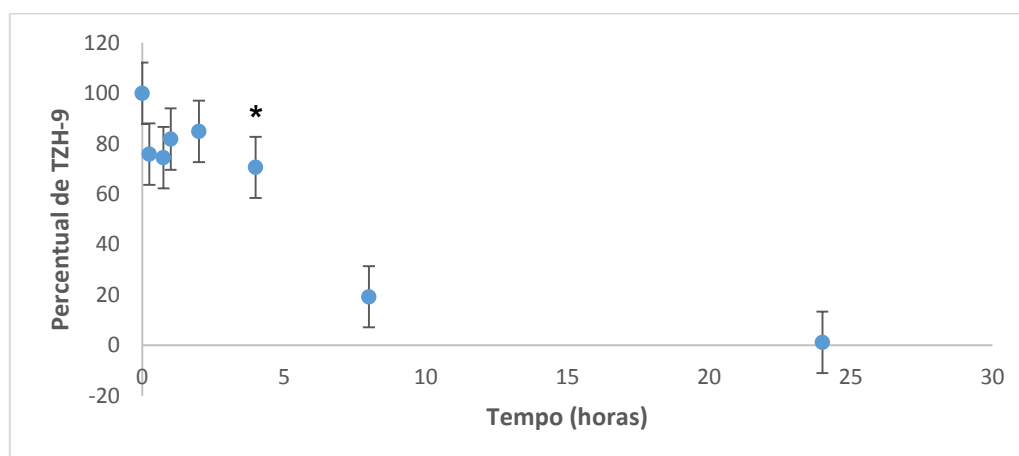


*Figura 24 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos (1500 ng/mL). \*A partir de 2 horas,  $p < 0,05$  em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).*

Na **tabela 5** e na **figura 25** estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade do composto em plasma de ratos na concentração de 6000 ng/mL, sob agitação e temperatura de 37°C. Houve diferença estatística significativa em relação ao tempo inicial a partir de 4 horas.

Tempo (h)	Percentual de decaimento (%)				
	I	II	III	Média	DP
0	100	100	100	100	0
0,25	-	70,37	81,35	75,86	7,762
0,75	82,89	73,44	66,96	74,43	8,010
1	87,39	80,43	77,64	81,82	5,021
2	82,40	85,87	86,36	84,88	2,159
4	74,42	70,78	66,60	70,60*	3,909
8	19,66	18,74	19,40	19,26	0,477
24	1,28	1,19	1,14	1,18	0,034

*Tabela 5 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de ratos na concentração de 6000 ng/mL. \*Apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey).*



*Figura 25 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos (6000 ng/mL). \*A partir de 4 horas,  $p < 0,05$  em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).*

Na **tabela 6** e **figura 26** estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade do composto em plasma de humanos na concentração de 1500 ng/mL, sob agitação e temperatura de 37°C. A partir de 15 minutos, já houve diferença

estatística significativa em relação ao tempo inicial, sugerindo que o fármaco sofre intensa ação das enzimas plasmáticas humanas. O estudo foi finalizado com 45 minutos, pois, após esse tempo, a concentração estava abaixo do limite de quantificação.

Percentual de decaimento (%)					
Tempo (h)	I	II	III	Média	DP
0	100	100	100	100	0
0,25	4,41	44,47	50,67	46,52*	3,60
0,5	42,37	34,41	50,02	42,27	7,80
0,75	12,79	13,97	15,18	13,98	1,19

Tabela 6 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de humanos na concentração de 1500 ng/mL. \*Apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey).

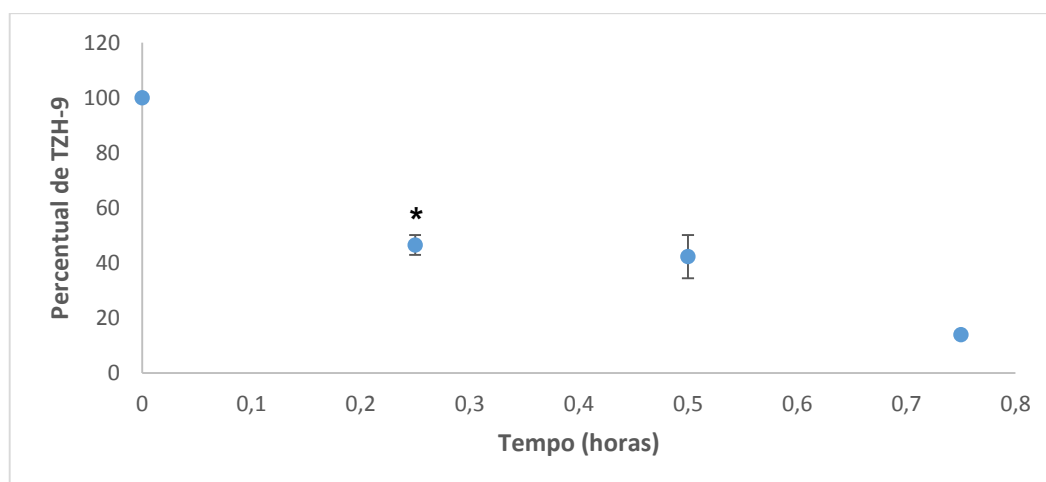


Figura 26 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de humanos (1500 ng/mL). \*A partir de 15 minutos,  $p < 0,001$  em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).

Na **tabela 7** e na **figura 27** estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade do composto em plasma de humanos na concentração de 6000 ng/mL, sob agitação e temperatura de 37°C. Nesta concentração, também houve diferença estatística significativa depois de 15 minutos a partir do tempo inicial. O ensaio foi

interrompido após 4 horas por apresentar concentrações abaixo do limite de quantificação.

Tempo (h)	Percentual de decaimento (%)				
	I	II	III	Média	DP
0	100	100	100	100	0
0,25	44,41	44,47	50,67	46,52*	3,60
2	42,36	34,41	50,02	42,26	7,80
4	12,79	13,97	15,18	13,98	1,19

Tabela 7 - Estabilidade ex vivo do TZH-9 em plasma de humanos na concentração de 6000 ng/mL. \*Apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao tempo zero (ANOVA seguido de Tukey).

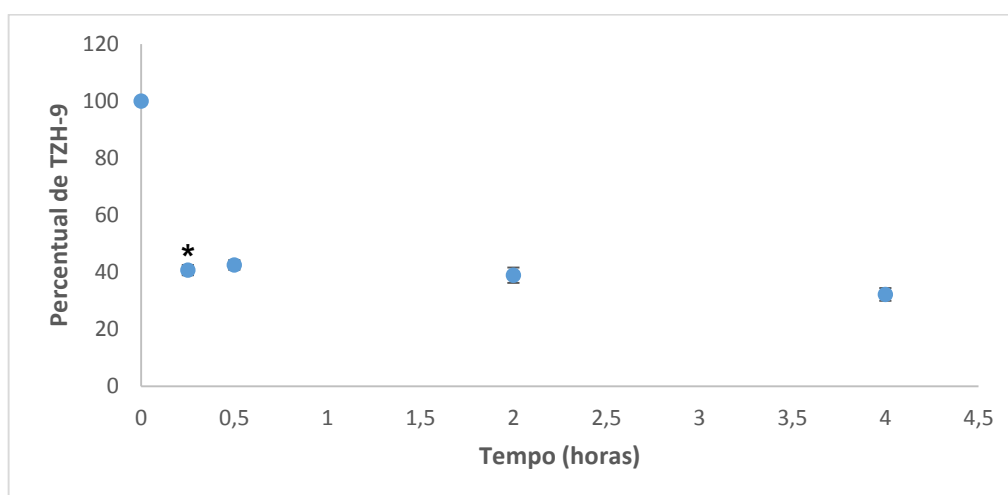


Figura 27 - Estabilidade do TZH-9 em plasma de humanos (6000 ng/mL). \*A partir de 15 minutos,  $p < 0,001$  em relação ao tempo inicial (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).

## 5. Discussão

### 5.1. Desenvolvimento do método bioanalítico

O método bioanalítico desenvolvido para quantificação de TZH-9 em plasma de ratos e de humanos desempenhará um papel significativo na avaliação e interpretação dos dados farmacocinéticos deste candidato a fármaco. O método empregou a técnica analítica de cromatografia líquida de ultra performance com

detector UV/Vis – FLR, que é extremamente rápida, eficiente e reprodutível. Antes da análise cromatográfica, a amostra biológica foi processada para remover interferentes endógenos, promover seletividade e especificidade do método ao analito de interesse e transferir o analito da matriz biológica a um solvente compatível com sistema cromatográfico. Os procedimentos gerais para a preparação da amostra consistem em precipitação da proteína, extração líquido-líquido e extração em fase sólida (SPE).

A precipitação de proteínas pode ser induzida pela adição de solvente orgânico, sal ou por alteração do pH, que influenciam a solubilidade de proteínas. É uma técnica rápida e simples, capaz de remover com eficiência interferentes da amostra (VENN, 2000). A precipitação das proteínas por solventes orgânicos ocorre devido a menor solubilidade das proteínas em solventes orgânicos do que em água. A precipitação das proteínas por adição de sal ocorre devido ao aumento da força iônica do sistema, que desloca a água de solvatação das proteínas para os íons, aumentando a interação proteína-proteína e diminuindo a solubilidade, fenômeno conhecido como *salting-out*. A precipitação das proteínas por alteração do pH ocorre devido a modificação da ionização dos grupos polares das proteínas, fazendo com que sua interação com o meio aquoso diminuía e precipite (BURGESS, 2009).

A extração líquido-líquido baseia-se na solubilidade diferencial e na partição de equilíbrio do analito entre a fase aquosa, amostra a ser extraída, e um solvente orgânico imiscível com água (SAID, 2010).

A extração em fase sólida é uma técnica de separação líquido-sólido usada para extrair analitos através da interação com fase sólida (sorvente), de modo semelhante aos mecanismos de cromatografia líquida em coluna. É uma técnica



cara, mas seletiva, que elimina os interferentes e eluí seletivamente o analito (JARDIM, 2010).

A análise dos resultados obtidos em cada experimento foi importante para delinear uma técnica final adequada. Na precipitação de proteínas por solvente, foi utilizado acetonitrila, que foi capaz eliminar os interferentes endógenos da amostra, entretanto, diluiu-a e diminuiu a sensibilidade do método. Então, foi testada a extração líquido-líquido, utilizando como solvente extrator acetato de etila. A vantagem desta técnica é a possibilidade de concentração do analito, o que melhora a sensibilidade do método. Contudo, a técnica não foi capaz de eliminar os componentes endógenos da amostra que interferiam no tempo de retenção do TZH-9. Realizou-se também a alteração de pH da amostra, mas tanto as amostras ácidas quanto básicas apresentaram resultados negativos. Testou-se também hexano como solvente extrator para extração líquido-líquido, devido sua grande lipofilicidade, porém, os resultados das extrações foram inadequados e descartou-se este solvente. A extração em fase sólida

Observando os resultados favoráveis das técnicas de precipitação de proteínas e de extração líquido-líquido com acetato de etila, foi delineado um método de extração que associou as duas técnicas e que apresentou o melhor resultado entre todos os experimentos. O método de extração consistiu, primeiramente, na precipitação de proteínas por solução saturada de sulfato de amônio e, em seguida, extração por acetato de etila. Dessa forma, os interferentes endógenos no tempo de retenção do TZH-9 foram eliminados e a amostra foi concentrada, aumentando a sensibilidade do método.

## 5.2. Estabilidade *ex vivo* do TZH-9 em plasma de ratos e plasma de humanos

Estabilidade de candidatos a fármacos em plasma é essencial para manutenção da concentração aceitável do fármaco, a fim de alcançar efeitos farmacológicos desejáveis. Os compostos que são instáveis em plasma tendem a ter um *clearance* rápido, meia-vida curta e pobre desempenho *in vivo* (DI, 2005).

Nos estudos de estabilidade *ex vivo* do TZH-9 em plasma de ratos e plasma de humanos, foi notável a diferença da estabilidade do composto. Em plasma de ratos, o TZH-9 foi estável por até 2 horas; enquanto em plasma de humanos, foi estável por somente 15 minutos. A diferença dos resultados sugere que algumas condições podem afetar o estudo de estabilidade em plasma, como tempo e quantidade de congelamento e descongelamento. No estudo de estabilidade em plasma de ratos, o plasma utilizado foi congelado e descongelado por diversas vezes; entretanto, no estudo de estabilidade em plasma de humanos, o plasma utilizado foi congelado por somente 8 horas e descongelado para realizar o estudo. O congelamento e descongelamento do plasma pode diminuir na atividade das enzimas plasmáticas, pois a cristalização da água do plasma causa uma alteração irreversível nas ligações de hidrogênio das enzimas, desnaturando as proteínas (LOPES, 1998), o que explicaria a maior estabilidade do TZH-9 em plasma de ratos.

## 6. Conclusão

O método bioanalítico validado demonstrou limites de confiança adequados para a quantificação do TZH-9 em plasma de ratos e humanos e, futuramente, pode ser aplicado em estudo de farmacocinética.

Os ensaios de estabilidade *ex vivo* em plasma de ratos demonstraram que o TZH-9 é susceptível a hidrólise pelas enzimas plasmáticas com resultados estatisticamente diferentes a partir de 2 horas de incubação.

Os ensaios de estabilidade *ex vivo* em plasma de humanos apresentaram resultados diferentes estatisticamente depois de 15 minutos, sugerindo intensa ação das enzimas plasmáticas humanas sobre o TZH-9.

Esta susceptibilidade do novo candidato à fármaco a ação de enzimas plasmáticas gera expectativas de que no estudo *in vivo* – administração em modelo animal – o parâmetro clearance seja elevado, o que pode determinar meia vida de eliminação curta. Os ensaios *in vitro* realizados até o momento pelo grupo de pesquisa com o novo candidato a fármaco produziram informações relevantes para o planejamento de ensaios *in vivo* e, ainda, poderão auxiliar a interpretação dos resultados nos estudos de farmacocinética.

## 7. Referências

1. APT, W. Treatment of Chagas Disease. Telleria, J.; Tibayrenc, M. **American Trypanosomiasis Chagas Disease, One Hundred Years of Research**. Chile, Elsevier, 2010, p. 809-825.
2. AYRTON, J. A guide to effective method development in bioanalysis. **Waters**, 2008.
3. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 03 jan. 2014.
4. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil.

5. BRESSOLLE F, BROMET P, AUDRAN M. Validation of liquid chromatography and gas chromatographic methods application to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B.** 686, 1996.
6. BURGESS, R. R.; Protein Precipitation Techniques. Methods in Enzymology, Volume 463, Chapter 20, USA, 2009.
7. CAPUTTO, M. E.; CICARELLI, A.; FRANK, F.; MONGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Argentina, v. 55, p. 155-163, jul. 2012.
8. CASTRO, S. L. The challenge an update of Chagas' disease chemotherapy: of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 53, p. 83-98, 1993.
9. CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T.M. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. **J Pharm Sci**, 86: 1127–1131, 1997.
10. COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, 1, p. 3-24, Jan. 2002.
11. COURA, J.R.; CANÇADO, J.R.; A história terapêutica da doença de Chagas. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>> Acesso em: 12 dez. 2013.
12. DI, L.; KERNS, E. H.; HONG, Y.; CHEN, H. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. **International Journal of Pharmaceutics**, pag. 110–119, 2005.
13. FIGUEIREDO, E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. UNIFAL, 2013.

14. JARDIM, I. C. S. F.; Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, Vol.2, N°1, pag.13-25, 2010.
15. LOPES, H. J. J. Enzimas no laboratório clínico - Aplicações diagnósticas. Gold Analisa Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil, 1998.
16. MENEZES, J. C. L.; VAZ, L. B. A.; VIEIRA, P. M. A.; FONSECA, K. S.; CARNEIRO, C. M.; TAYLOR, J. G. Synthesis and Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Diaryldiazepines. **Molecules**, vol. 20, pag. 43-51, 2015.
17. MICROMEDEX. Micromedex Healthcare Series Date Base, 2015.
18. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Executiva. Datasus. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 05 dez. 2013.
19. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: < <http://www.paho.org> >. Acesso em: 05 dez. 2013.
20. 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**, vol.24, no.1, São Paulo, Janeiro, 2001.
21. SAID, R. Application of new technology LC-MS/MS for determination of therapeutic drugs, Doctoral degree thesis, Department of Medicine Division of Clinical Pharmacology Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, 2010.
22. SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, Madrid-Spain, v. 17, p. 423-452, 2010.
23. VENN, R.F. Principles and practice of bioanalysis, London: Taylor and Francis. XVIII; 364, 2000.

24. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases: Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/chagas/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/)>. Acesso em: 05 dez. 2013.

Araraquara, 11 de janeiro de 2016

De acordo,

---

Evelin dos Santos Martins

De acordo,

---

Rosângela Gonçalves Peccinini