



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
SINTÉTICOS E BIOATIVOS

AVALIAÇÃO ANALÍTICA E BIOANALÍTICA DA RIPARINA I

MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

JOÃO PESSOA

2015

MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

AVALIAÇÃO ANALÍTICA E BIOANALÍTICA DA RIPARINA I

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr.: Josean Fechine Tavares

Coorientadora: Dra. Elisana Afonso de Moura Pires

JOÃO PESSOA

2015

T332a Terto, Marcio Vinicius Cahino.

Avaliação analítica e bioanalítica da riparina I /
Marcio Vinicius Cahino Terto. - João Pessoa, 2015.
110 f.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Riparina I. 2. Caracterização. 3. Estado sólido. 4.
Método bioanalítico. I. Título

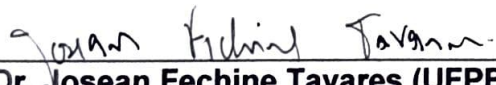
UFPB/BC

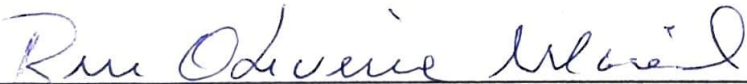
MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

AVALIAÇÃO ANALÍTICA E BIOANALÍTICA DA RIPARINA I

Aprovado em: 25 / 11 / 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (UFPB - Orientador)


Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo (UFPB – Avaliador interno)

Prof. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça (UFPB – Avaliador externo)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares**, pela confiança, incentivo e dedicação. Agradeço pelo encorajamento, pela disponibilidade dispensada em todas as situações e por suas sugestões que foram importantes para concretização deste projeto e para o meu aprendizado.

A minha coorientadora **Dra. Elisana A. Moura Pires** por todo apoio, conselhos, paciência, dedicação, empenho e ensinamentos. Sendo peça fundamental durante o desenvolvimento deste trabalho, estando sempre presente e disposta a ajudar na bancada. Uma pessoa inspiradora como um grande exemplo de ser humano e profissional.

À banca examinadora **Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo e Profa. Dra. Elisângela A. M. Medonça** pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao meu amigo, cunhado e grande incentivador **Prof. Dr. Sócrates Golzio**. Sempre colocando palavras positivas diante as adversidades.

Aos alunos da turma do mestrado 2013 e 2014, especialmente aos amigos **Ayala, Kaio, Rose, Ingrid, Diego, Rayssa, Denise, Andreza, Laiane, Ceíça, Adriano e Yuri**, pelos momentos compartilhados, companheirismo e agradável convívio.

Aos alunos de Iniciação Científica **Ana Rita Rodrigues e Jociano Lins** por toda contribuição na bancada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa** pelo apoio, incentivo e dedicação ao laboratório. Fazendo um ambiente propício para o desenvolvimento e comunicação entre os alunos.

A **Crispim** por ajudar na parte mais difícil, para mim, do trabalho. A eutanásia dos ratos, no qual tenho profundo agradecimento.

A minha mãe **Walquiria Lima Cahino**, que tenho uma imensa gratidão por acreditar e nunca desistir do seu filho. Tudo que sou hoje devo ao seu imenso amor e dedicação aos longos de anos maravilhosos que tive e tenho o privilégio de passar ao seu lado.

A minha amada esposa **Caroline Alves Cahino**, que com muito incentivo, paciência e amor, me proporcionou um ambiente frutífero para o desenvolvimento pessoal e profissional, ajudando a passar por obstáculos durante toda essa jornada

A minha filha **Kyra Alves Cahino**, que veio transformar a minha vida como nunca eu poderia imaginar, enchendo a casa de luz, amor e vida. Te amo por todo sempre.

Aos meus familiares pelo carinho, palavras, elogios e muita união que completam e descreve o significado da palavra Família na sua amplitude.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A **Deus** por tudo! Obrigado pela sua presença ao meu lado me acalmando, direcionando e erguendo em todos os momentos.

"Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes."

Escopo.

RESUMO

A riparina I é uma alcanida obtida a partir da *Aniba Riparia* com relevante atividade farmacológica. Embora estudos farmacológicos sejam extensos, a avaliação das características do estado sólido desta alcanida e estudos farmacocinéticos ainda são pouco relatados. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização do estado sólido de cinco lotes de riparina I, obtidos a partir do mesmo processo de síntese, utilizando diferentes técnicas analíticas e o desenvolvimento de método bioanalítico para estudos farmacocinéticos. A caracterização foi realizada através de ensaios de avaliação do perfil de impurezas, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD), em nível molecular utilizando ensaios com infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e em nível de partícula através das técnicas analíticas; calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raio X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massas. O método bioanalítico para a quantificação de Riparina I foi desenvolvido utilizando plasma de ratos wistar após a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Certificado n° 0308/13, utilizando a CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Os lotes de riparina I apresentaram perfil de impurezas cromatográficas semelhantes no CLAE-DAD. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C confirmaram a identidade da riparina I para os cinco lotes, além de revelar a presença de impurezas no espectro de ^1H , sendo o lote RIP-1 o mais puro entre os lotes avaliados. Os dados do espectro de IV corroboraram com a identidade da riparina I. As imagens da MEV evidenciaram cristais com hábitos cristalinos diferentes, possivelmente por alterações no processo de síntese. Os dados DSC confirmaram alterações na estrutura cristalina, onde foi possível observar que os lotes RIP-2 e RIP-3 apresentaram dois picos endotérmicos característicos de fusão, inferindo que as amostras apresentam misturas de cristais. Os dados TG mostraram processo de decomposição em uma única etapa característico da volatilização da riparina I, dados confirmados nos pirogramas obtidos para os cinco lotes estudados. Os dados DRX confirmaram a presença de estruturas cristalinas distintas pela presença de picos no eixo 2θ , nos ângulos 12° , $20\text{-}25^\circ$ e 34° , diferentes nas difratogramas das amostras. A caracterização do estado sólido dos lotes de riparina I evidencia a necessidade de maior controle no processo de síntese. Para o desenvolvimento do método bioanalítico as amostras de plasma foram submetidas ao preparo com diferentes métodos de extração, sendo o método de precipitação de proteínas utilizando $400\ \mu\text{L}$ de MeCN o que apresentou maior porcentagem de recuperação em torno de $88,97 - 95,32\%$. O método bioanalítico validado é linear na faixa de $5,0$ a $750\ \text{ng/mL}$. O tempo de execução do método é de $6,0\ \text{min}$. A variabilidade intra dia e inter dia inferior a $9,5\%$. A maior variação no erro padrão relativo da média foi de, $-9,08\%$. O maior valor de efeito matriz observado foi na concentração de $10,0\ \text{ng/mL}$ ($-11,06 \pm 6,67$). A riparina I apresentou estabilidade na matriz plasma em 3 ciclos de congelamento/descongelamento, 8 horas após processamento, 5 horas na matriz em temperatura ambiente e congelado a -20°C por 30 dias. O método desenvolvido constitui uma ferramenta útil para os estudos de farmacocinética da riparina I.

Palavras-chave: Riparina I; Caracterização; Estado sólido; Método bioanalítico.

ABSTRACT

The riparin I is a alkaloid obtained from the *Aniba riparia* with relevant pharmacological activity. Although pharmacological studies are lengthy, the evaluation of solid state features of this alkaloid and pharmacokinetic studies are poorly reported. Thus, this study aimed to characterize the solid state of five lots of riparin I, obtained from the same synthetic process, using different analytical techniques and the development of bioanalytical method for pharmacokinetic studies. The characterization was performed by impurity profile of evaluation tests, using high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), at the molecular level using tests with infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR ^1H and ^{13}C) and particle level through analytical techniques; differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and pyrolysis coupled to gas chromatography / mass spectrometry. The bioanalytical method for the quantification of Riparin I was developed using plasma of Wistar rats after approval by the Ethics and Animal Research Committee (CEPA) of the Federal University of Paraíba (UFPB), Certificate No. 0308/13, using HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS). Lots of riparin I had access to similar chromatographic impurities in HPLC-DAD. The ^1H and ^{13}C NMR spectra confirmed the identity of riparin I for the five lots, and reveal the presence of impurities in the ^1H spectrum, with RIP-1 set the purest among the evaluated plots. The IR spectrum data corroborate the identity of riparin I. The SEM images show crystals with different crystal habits, possibly by changes in the synthesis process. The DSC data confirmed changes in the crystal structure, where it was observed that the RIP-2 batches and RIP-3 had two characteristic melting endotherms, implying that the samples show crystal mixtures. TG data showed the decomposition process into a single step characteristic of the volatilization of riparin I, data confirmed in pyrograms obtained for the five batches studied. The XRD data confirms the presence of different crystalline structures by the presence of peaks in 2θ axis, the angles 12° , $20\text{--}25^\circ$ and 34° , the diffraction patterns of different samples. The characterization of the solid state of lots of riparin I highlights the need for greater control in the synthesis process. For the development of bioanalytical method plasma samples were submitted to preparation with different extraction methods, and the protein precipitation method using 400 μL of MeCN presented the highest percentage of recovery around 85.0 to 95.0% . The validated bioanalytical method is linear in the range of 5.0 to 750 ng / mL. The method of execution time is 6.0 min. The intra day and inter day variability less than 9.5%. The greatest variation in the relative standard error of the mean was of -6.59%. The riparin I was stable in plasma matrix 3 cycles of freeze / thaw, 8 hours after processing, the matrix 5 hours at room temperature and frozen at -20°C for 30 days. The developed method is a useful tool for pharmacokinetics studies of riparin I.

Keywords: Riparin I; Description; Solid state; Bioanalytical method.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Mapa da distribuição da vegetação da família Lauraceae	22
Figura 2. Folha seca da <i>Aniba riparia</i>	23
Figura 3. Fruto verde da <i>Aniba riparia</i>	24
Figura 4. Estrutura química da riparina I, II e III	25
Figura 5. Estrutura da Riparina I	37

CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DA RIPARINA I

Figura 1. Perfil cromatográfico de impurezas dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5.	43
Figura 2. Espectro de RMN de ^1H dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5, em CDCl_3 .	45
Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5, em CDCl_3 .	46
Figura 4. Espectros de absorção IV dos lotes de Rip 1-5.	48
Figura 5. Imagens obtidas pó espectrometria eletrônica de varredura (MEV) dos lotes de riparina RIP 1-5	50
Figura 6. Curvas calorimétricas na razão de aquecimentos de $2\text{ }^\circ\text{C/min}$ dos lotes de riparina RIP1-5.	51
Figura 7. DSC-fotovisual dos lotes de riparina I (Lotes RIP 1-5) na razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C/min}$	53
Figura 8. Curvas termogravimétricas dos lotes de riparina I (Lotes RIP 1-5) na razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C/min}$	55
Figura 9. Pirograma dos diferentes lotes de riparina RIP 1-5 obtidos nas temperaturas de 250 e $500\text{ }^\circ\text{C}$, mostrando o pico da riparina I (1), o espectro de massa da riparina (2) e o espectro de massa da trietilamina (3)	56
Figura 10. DRX das amostras RIP 1-5	58
Figura 11. Espectros de RMN de ^{13}C de sólido para os 5 lotes lotes de riparina I	59

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE RIPARINA I EM PLASMA DE RATOS WISTAR

Figura 1. Espectros ESI(+) – EM de riparina I, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 256,55 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 135,01	78
Figura 2. Influência dos parâmetros na variável de resposta para a ionização da Riparina I no espectrômetro de massa	79
Figura 3. Gráfico da superfície de resposta da influência do fluxo e pressão na ionização da riparina I.	80

Figura 4. Espectros ESI(+) – EM de riparina B, demonstrando (A) 81
espectro do íon precursor, m/z 286,79 e (B) espectro de fragmentação,
com fragmento principal m/z 164,97

Figura 5. Cromatograma CLAE-EM representativo da condição 82
cromatográfica pré-definida para eluição da riparina I e riparina B em
solução (H₂O:MeCN) aditivada com 0,1% de NH₄OH

Figura 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM para amostras branco 85
de plasmas normal (A), lipêmico (B), hemolisado (C), plasma
contaminado com riparina I (D), plasma contaminado com riparina B (E),
plasma contaminado com PI (50 ng/mL) e analito no limite inferior de
quantificação (5 ng/mL) (F) para avaliação da seletividade do método.

Figura 7. Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da 87
regressão linear do método para determinação de teor de Riparina I em
plasma (n=30)

Figura 8. Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na 89
precisão método para quantificação de riparina I em plasma (n = 90)

Figura 9. Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na 91
exatidão método para quantificação da Riparina I em plasma (n=90)

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Caracterização do Estado Sólido da Riparina I

Tabela 1. Comparação dos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio e carbono da riparina I com a literatura	44
Tabela 2. Dados dos espectros de infravermelho dos lotes da Rip-1	47

Capítulo III – Desenvolvimento e Validação de Método Bionalítico para a Quantificação de riparina I em plasma de ratos wistar

Tabela 1. Recuperação para as Riparina A (PI) e Riparina I no método de extração Líquido-Líquido para os diferentes solventes	83
Tabela 2. Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação do teor de Riparina I em plasma	88
Tabela 3. Exatidão do método para quantificação da riparina I em plasma	90
Tabela 4. Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA, após 3 ciclos de congelamento e descongelamento	92
Tabela 5. Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de curta duração	93
Tabela 6. Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de longa duração	94
Tabela 7. Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de pós-processamento.	94
Tabela 8. Estabilidade da solução estoque da riparina I armazenada a temperatura de -4 °C por 15 horas	95
Tabela 9. Estabilidade da solução estoque do PI armazenada a temperatura de -4 °C por 15 horas	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = Análise de Variância

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18: ocatadecilsilano

CG = Cromatografia Gasosa

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CQA = Controle de Qualidade Alto

CQB = Controle de Qualidade Baixo

DAD = Arranjo de Fotodiodo

DP= Desvio padrão

DSC = Calorimetria de Varredura Diferencial

EM = Espectrometria de Massas

EPM = Erro Padrão da Média

g: grama

H₂O: Água

IR = Intensidade Relativa

IV = Infravermelho

LIQ = Limite Inferior de Quantificação

MeOH: Metanol

DRX = Difração de Raios-X

PI= Padrão interno

PIR = Pirólise

RIP = Riparina I

T = Temperatura

T_f = Temperatura final

TG = Termogravimetria

T_i = Temperatura inicial

ΔH = entalpia

ΔH_f = calor de fusão

θ = Ângulo de difração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1. Família Lauraceae	22
3.1.1. Aniba Riparia (Nees) Mez	23
3.2. Riparina I (N-benzoiltiramina)	25
3.3. Caracterização do insumo farmacêutico ativo (IFA)	26
3.4. Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em matriz biológica	28
3.5. Métodos de extração em matriz biológica	31
4. CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO DA ESTADO SÓLIDO DA RIPARINA I	35
4.1. Introdução	35
4.2. Materiais e Métodos	37
4.2.1. Materiais	37
4.2.2. Avaliação do perfil de impurezas	37
4.2.2.1. Determinação do Teor	37
4.2.2.2. Análise do Perfil de Impurezas	38
4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C	38
4.2.4. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	39
4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
4.2.6. Estudos termoanalíticos	39
4.2.6.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	39
4.2.6.2. DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)	39
4.2.6.3. Termogravimetria (TG)	40
4.2.6.4. Pirólise Acoplada a CG-EM	40
4.2.6.5. Difração de raio-X (DRX)	41
4.2.6.6. Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (^{13}C -RMN)	41
4.3. Resultados e Discussão	41
4.3.1. Avaliação do Perfil de impurezas	42
4.3.1.1. Teor da Riparina I e Perfil de impureza	42
4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	43
4.3.3. Espectroscopia no Infravermelho	47
4.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49

4.3.5. Análise Térmica	51
4.3.5.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
4.3.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial Acoplada ao Fotovisual	52
4.3.5.3. Termogravimetria (TG)	54
4.3.6. Pirólise acoplado ao CG/EM	55
4.3.7. Difração de raio X (DRX)	57
4.3.8. Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C no Estado Sólido	58
4.4. Conclusão	60
4.5. Referências	60
5. CAPÍTULO III - Desenvolvimento e Validação de Método Bionalítico para a quantificação de Riparina I em plasma de ratos Wistar por CLAE-EM	65
5.1. Introdução	65
5.2. Material e Método	67
5.2.1. Materiais	67
5.2.2. Equipamentos	68
5.2.3. Desenvolvimento e Validação do método bioanalítico por CLAE-EM	68
5.2.3.1. Detecção por espectrometria de massas	68
5.2.3.2. Condições cromatográficas	69
5.2.3.3. Método de Extração no Plasma	69
5.2.3.3.1. Precipitação de proteínas	70
5.2.3.3.2. Extração líquido-líquido	70
5.2.4. Validação do Método Bioanalítico	71
5.2.4.1. Animais	71
5.2.4.2. Protocolo e procedimento in vivo	71
5.2.4.3. Ensaios de Validação	71
5.2.4.3.1. Seletividade	71
5.2.4.3.2. Recuperação	72
5.2.4.3.3. Efeito Matriz	72
5.2.4.3.4. Efeito residual	73
5.2.4.3.5. Linearidade	73
5.2.4.3.6. Precisão e Exatidão	74

5.2.4.3.7. Avaliação da Estabilidade	75
5.2.4.3.7.1. Estabilidade do analito em matriz biológica	75
5.2.4.3.7.1.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.	75
5.2.4.3.7.1.2. Estabilidade de curta duração	75
5.2.4.3.7.1.3. Estabilidade pós-processamento	76
5.2.4.3.7.1.4. Estabilidade longa duração	76
5.2.4.3.7.2. Estabilidade do analito e PI em solução	76
5.2.5. Análise estatística	77
5.3. Resultados e Discussão	77
5.3.1. Desenvolvimento do método analítico	77
5.3.2. Métodos de Extração	82
5.3.3. Validação do Método Bioanalítico	84
5.3.3.1. Seletividade	84
5.3.3.2. Recuperação e Efeito Matriz	85
5.3.3.3. Linearidade	86
5.3.3.4. Precisão	88
5.3.3.5. Exatidão	89
5.3.3.6. Estabilidade da riparina I no plasma	92
5.3.3.6.1. Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento	92
5.3.3.6.2. Estabilidade de curta duração	93
5.3.3.6.3. Estabilidade longa duração	93
5.3.3.6.4. Estabilidade pós-processamento	94
5.3.3.6.5. Estabilidade PI e analito em solução	95
5.4. Conclusão	96
5.5. Referências	96
6. CONCLUSÃO	98
7. PERSPECTIVAS	101
8. REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO



1. Introdução

No âmbito do desenvolvimento de medicamentos a avaliação sistemática das características físico-químicas e biológicas do insumo farmacêutico ativo (IFA) são fatores primordiais para a garantia da segurança, eficácia e qualidade da formulação farmacêutica (SANTOS et al, 2015).

A qualidade do produto acabado está diretamente ligado a qualidade dos insumos farmacêuticos utilizados na produção de medicamentos, garantindo que, após a administração ao paciente o fármaco atinja níveis plasmáticos dentro do índice terapêutico, ou seja, cheguem a circulação sistêmica em concentrações seguras e eficazes (GUO, SHALAEV & SMITH, 2013).

Desta forma, estudos investigativos que avaliem as propriedades intrínsecas da matéria-prima do IFA, tais como, diversidade cristalina, atendimento aos requisitos de qualidade físicos, físico-químicos, a presença de impurezas e estabilidade, é crítico na obtenção de fármacos com alta qualidade (BERNARDI et al, 2013).

Inserido neste contexto, a Indústria Farmacêutica, submete seus fármacos e protótipos, em toda as etapas do processo produtivo do medicamento, a ensaios que avaliem possíveis alterações aos parâmetros e especificações de qualidade estabelecidos, que possam vir a apresentar implicações comerciais e industriais significativas em vários domínios (KUMINEK et al, 2013).

Durante o processo de obtenção de uma matéria-prima, fatores como rota de síntese, condições de reação, reagentes de partida, solventes utilizados e etapas de purificação, podem alterar a forma cristalina do IFA, além de resultar em produtos com purezas distintas (BETTINETTI et al., 2006; PATEL et al., 2012).

Sendo assim, é necessário o controle de parâmetros críticos do processo de síntese de fármacos, para que não ocorram alterações físicas e físico-químicas, de forma a garantir a pureza, reprodutibilidade da forma sólida obtida e consequentemente a atividade farmacológica e as suas propriedades biofarmacotécnicas (ICH, 2006).

A Riparina I é uma alcanida isolada do fruto verde da planta *Aniba riparia*. As alcanidas são metabólito secundário que vêm despertando o interesse da comunidade científica, devido seu largo espectro de atividade biológica. O isolamento e síntese da riparina I, como também, a II e III foram feitas pela primeira vez no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA-FILHO et al., 1990).

O potencial farmacológico da Riparina I, torna relevante o conhecimento detalhado de parâmetros físicos e físico-químicos e especificações que determinem parâmetros de qualidade biofarmacotécnicas e assegurem o sucesso do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica utilizando esta matéria-prima.

Considerando-se a importância de estudos de caracterização da estrutura cristalina da Riparina I, utilizando várias técnicas analíticas e os estudos farmacocinéticos de moléculas com importante atividade terapêutica, decidimos nortear este trabalho vislumbrando determinar parâmetros de qualidade desta matéria-prima, avaliando a reprodutibilidade da sua síntese, além de desenvolver método bioanalítico para avaliação farmacocinética.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar diferentes lotes da matéria-prima Riparina I e desenvolver de método bioanalítico para estudo farmacocinético.

2.2. Objetivos Específicos

- + Caracterizar o estado sólido de 5 lotes da riparina I obtidos a partir do mesmo processo de síntese;
- + Avaliar o perfil de impurezas dos diferentes lotes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo Diodo (CLAE-DAD);
- + Avaliar propriedades físico-químicas dos lotes através das técnicas Calorimetria Exploratória Diferencial, Termogravimetria, Infravermelho, Microscopia Eletrônica de Varredura, Difração de Raio X, Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no estado sólido.
- + Determinar método de extração da Riparina I em plasma de ratos wistar;
- + Avaliar ionização química da Riparina I dentro do conceito do Quality by Design (QbD);
- + Desenvolver e validar método bioanalítico para estudos farmacocinéticos da matéria-prima em plasma de ratos wistar por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM);

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

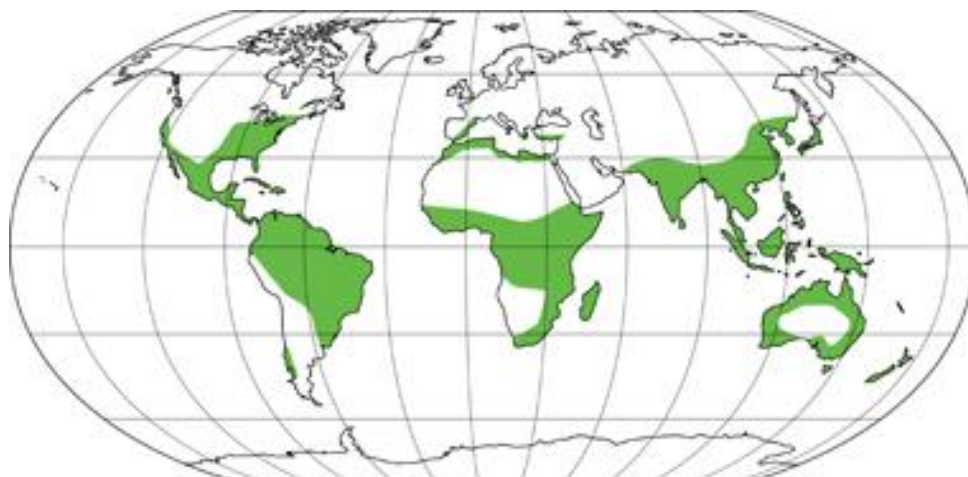


3. Fundamentação Teórica

3.1. Família Lauraceae

A família Lauraceae engloba 50 gêneros e 2.500 - 3.000 espécies dispersas ao redor do mundo (Figura 1). Possui distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar e pouco expressiva no sul da África, (SANTOS et al., 2001). No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram citados para a região Nordeste do Brasil. (SANTOS et al., 2013).

Figura 1. Mapa da distribuição da vegetação da família Lauraceae.



Fonte: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/lauraceae.jpg.

São economicamente e ecologicamente importante, como muitos das espécies da família são usadas na medicina popular para lesões cutâneas, distúrbios gástricos, como um anti-inflamatório, e por problemas circulatórios em ambas as culturas ocidentais e orientais, também têm ação hipoglicêmica e propriedades ansiolíticas (SANTOS et al., 2001). O conhecimento sobre a família Lauraceae ainda é incipiente em face de sua grande importância nos ecossistemas tropicais (SANTOS et al., 2013).

Os principais generos incluem *Aniba* (40 spp.), *Ocotea* (300-400 spp.), *Persea* (150 spp.), *Cinnamomum* (250 spp.), *Litsea* (400 spp.), *Neolitsea* (80

spp.), *Lindera* (100 spp.), *Laurus* (2 spp.) e *Cryptocarya* (200-250 spp.) (MARQUES, 2001).

3.1.1. *Aniba riparia* (Nees) Mez

A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez é popularmente conhecida no Brasil como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (MARQUES et al., 2001), apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação auriolada, ramos de 3 mm de espessura, marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (VICENTINI et al., 1999) (Figura 2).

A ocorrência de aproximadamente 40 espécies de *Aniba*, no Brasil está dividida em 3 grupos, onde esta divisão foi determinada devido à natureza química do constituinte predominante o óleo essencial:

- O grupo do linalol (*A. roseodora*, *A. duckei*);
- O grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kosterm., *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez, *A. guianensis* Aubl.);
- O grupo do alibenzeno (*A. canellita*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez, *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm) (Castelo-Branco et al., 2000; Marques et al., 2001).

Figura 2. Folha seca da *Aniba riparia*.



Fonte: <http://web.science.uu.nl/Amazon/VTGG/Lauraceae/Aniba/slides/Aniba%20ripa%20ria%20%201.html>.

Esta planta tem o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, as montanhas do norte da Venezuela e leste e sul do Brasil (CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Do fruto verde da planta (Figura 3) foram isoladas uma classe especial de alcaloides contendo uma função alcalamida, que foram chamadas de riparina I (éter metílico de N-benzoil tiramina) (1), riparina II (éter metílico de N-2-hidroxibenzoil tiramina) (2) e riparina III (éter metílico de N-2,6- dihidroxi-benzoil tiramina) (3) em homenagem a planta (BARBOSA-FILHO et al., 1987; THOMAS et al., 1994; SOUZA et al., 2008).

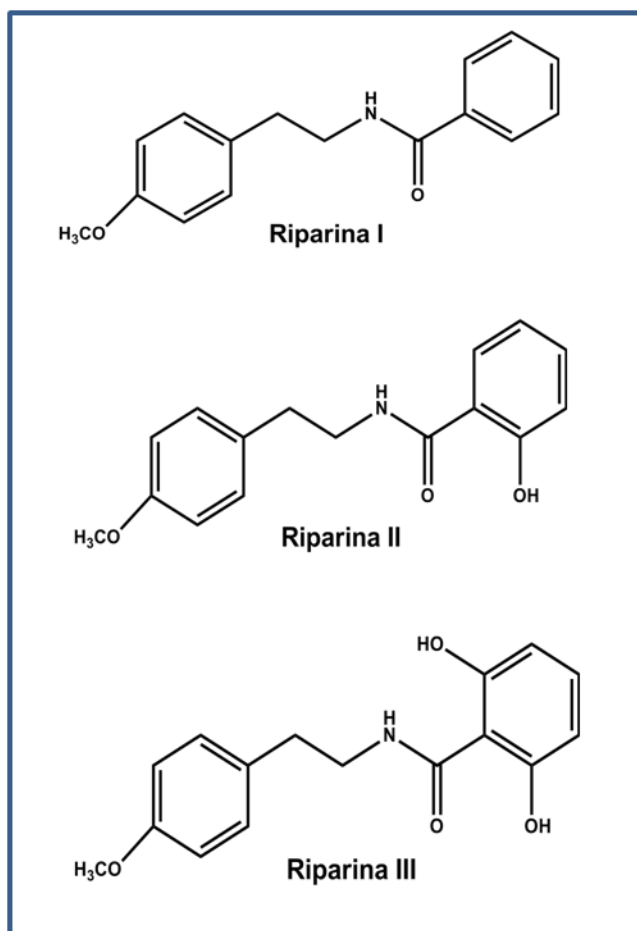
Figura 3. Fruto verde da *Aniba riparia*.



Fonte: http://lauraceae.myspecies.info/sites/lauraceae.myspecies.info/files/Aniba_firmula_JR51964.jpg

As riparinas I, II e III (Figura 4), possuem atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré-clínicos, como as atividades ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (LEITE, 2008), além de ser eficaz como antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* (CATÃO et al., 2010). Estes resultados reunidos mostraram que as três substâncias isoladas da planta *A. riparia* apresentaram resultados semelhantes, concluindo que as três apresentaram efeito ansiolítico, desprovidas de efeitos sedativo ou relaxante muscular, portanto, com menos efeitos colaterais que os benzodiazepínicos clássicos. (SOUZA et al., 2008).

Figura 4. Estrutura química da riparina I, II e III.



Fonte: Própria do autor.

3.2. Riparina I (N-benzoiltiramina)

A atividade ansiolítica e antidepressiva foi atribuída aos alcalóides isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Barbosa-Filho et al., 1987; Souza et al., 2008; Castelo-Branco et al., 2000).

A atividade antinociceptiva de constituintes da *Aniba riparia* também foi analisada em testes com a riparina I em modelos comportamentais de dor induzida química e termicamente em roedores. Os resultados obtidos sugerem que a riparina I apresenta atividade antinociceptiva relacionada a mecanismos periféricos (via do óxido nítrico) e mecanismos centrais, descartando o envolvimento do sistema opióide (ARAÚJO et al., 2009).

Esta alcalamida apresenta ainda atividade antimicrobiana, sendo a sua ação farmacológica mais bem conceituada é sua atuação como um potente

relaxante da musculatura lisa. (THOMAS et al., 1994; CASTELO-BRANCO et al., 2000). A riparina I também apresenta o efeito hipotensor e bradicárdico observado nas riparinas II e III. Esta ação parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

Apesar do grande potencial farmacológico da Riparina I, estudos biofarmacotécnicos ainda são pouco relatados na literatura.

3.3. Caracterização do insumo farmacêutico ativo (IFA)

O sucesso do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica baseia-se inicialmente no profundo conhecimento dos insumos farmacêuticos que serão utilizados na formulação. Em relação ao insumo ativo, este conhecimento em relação as características físico-químicas e especificações são primordiais para a garantia da segurança e eficácia terapêutica (STORPIRTS, 2009).

No processo de síntese de uma matéria-prima farmacêutica é necessário que se obtenha produto final com pureza adequada e reprodutibilidade no processo, para que não ocorram alterações na estrutura cristalina do IFA e conseqüentemente variações nas propriedades físicas e químicas (SANTOS et al, 2013).

A tendência de uma substância se organizar em diferentes formas cristalinas mantendo sua estrutura química é denominada polimorfismo. Distintas formas polimórficas de uma substância podem apresentar propriedades físico-químicas diferentes, dentre as quais as temperaturas de fusão e sublimação, capacidade térmica, densidade, volume, dureza, cor, solubilidade, taxa de dissolução, entre outras (BETTINETTI et al., 2006).

Grande parte dos fármacos podem se apresentar em formas no estado sólido diferentes, como polimorfos, solvatos e estado amorfo, e desta forma apresentar distintas propriedades físico-químicas, mecânica e biofarmacêutica. Neste sentido, a caracterização desses insumos no estado sólido mantém-se de extrema importância durante a fase inicial de desenvolvimento de medicamentos (SHETE et al., 2010).

Tendo em vista, as várias implicações do ponto de vista biofarmacotécnico, da diversidade cristalina dos IFA, reconhece-se que para evitar problemas durante o desenvolvimento de medicamentos, a

caracterização física de fármacos a granel, excipientes, e misturas destes deve tornar-se parte do processo normal. As técnicas de caracterização física de sólidos farmacêuticos são classificadas de acordo com o nível molecular (os que estão associados com moléculas individuais), o nível de partículas (partículas sólidas individuais), ou o nível de aglomerados (aqueles associados com um conjunto de espécies de partículas) (MAXIMIANO et al., 2010; BRITAIN, 2011).

A caracterização do tamanho e forma dos sólidos farmacêuticos utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido amplamente aplicada na indústria farmacêutica para avaliar as mudanças relacionadas com os processos farmacêuticos (compactação, a compressão, a densidade do pó, dureza, e dissolução) e a biodisponibilidade da droga em fluidos corporais (BERNARDI et al, 2013).

A espectroscopia por absorção no infravermelho tem sido utilizada na maior parte das investigações primárias de polimorfismo, pois é uma técnica robusta e disponível na maioria dos laboratórios. Os modelos de ligações de hidrogênio entre os átomos são muitas vezes diferentes entre as formas polimórficas e os grupos funcionais afetados demonstram deslocamentos de vários graus, indicando estruturas cristalinas de hábitos diferentes (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

O emprego da difração de raio X (DRX) é de grande importância na investigação e proteção de patentes de polimorfos de produtos farmacêuticos. A difratometria de raios-X em pó fornece a identificação mais direta e definitiva dos polimorfos e podem oferecer um meio para a análise quantitativa de misturas polimórficas. A análise de DRX com base em ângulos de difração de pico e as intensidades correspondentes é muitas vezes preferido para a quantificação de formas polimórficas (GYSEGHEM , 2009).

O RMN de estado sólido está ganhando cada vez mais importância na determinação da estrutura, conformação e caracterização cristalográfica de polimorfos, pois pode determinar a natureza do polimorfismo a nível molecular, uma vez que a frequência de ressonância de núcleos será diferente

quando suas relações espaciais são alterados como resultado das variações estruturais (GUO, SHALAEV & SMITH, 2013).

A análise térmica tem sido utilizada em muitos campos a exemplo da caracterização de minerais, substâncias inorgânicas, metais, cerâmicas, materiais eletrônicos, polímeros, substâncias orgânicas, produtos farmacêuticos, alimentos e organismos biológicos (BROWN; GALLAGHER, 2008; CHENG et al., 2000; OZAWA, 2000).

Na indústria farmacêutica a implementação da análise térmica surge como um método analítico, qualitativo e comparativo, capaz de produzir resultados rápidos e reprodutíveis, visando a análise global da qualidade tecnológica de medicamentos (CRAIG; READING, 2007; MACÊDO, 1996).

As técnicas térmicas como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Termogravimetria (TG) tem uso significativo em vários tipos de estudos, incluindo polimorfismo e investigação pseudo-polimorfismo (AGRAWAL et al 2004; LANGA et al, 2015), caracterização de produtos farmacêuticos [MOURA et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011], estudos de compatibilidade (PINTO et al, 2010), e avaliação de estabilidade de fármacos (CARINI et al 2009).

3.4. Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em matriz biológica

O desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos empregados na determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em fluidos biológicos desempenha um papel significativo da avaliação e interpretação da biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e na obtenção de dados toxicocinéticos do fármaco e seus metabólitos. A qualidade destes estudos está diretamente relacionada à qualidade do método bioanalítico (SHAH et al., 2007; Miranda et al., 2013).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade,

reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos (BRASIL, 2003).

No Brasil, a ANVISA publicou em 17 de maio de 2012 a Resolução RDC nº 27, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, incluindo novos ensaios de validação, como a avaliação de efeito residual e de efeito matriz, em relação à RDC 899/2003 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012; MIRANDA et al., 2013).

Durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, todas as variáveis devem ser consideradas, incluindo o procedimento de amostragem, de preparo da amostra, de separação cromatográfica, de detecção e avaliação de dados. O processo de validação inclui a avaliação da estabilidade do analito na matriz biológica (BRESSOLE et al., 1996; MIRANDA et al., 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos em matrizes biológicas. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, necessita de uma técnica confirmatória quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) é também necessária (LANÇAS, 2012).

Em comparação com os detectores de tradicionais, tais como espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-VIS) ou fluorescência, o detector de Espectrometria de Massas (MS) permite a identificação significativamente mais fiável dos compostos que eluem da CLAE (ANNELI KRUIVE et al., 2015).

A espectrometria de massas uma técnica analítica instrumental utilizada para a análise, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a relação da razão massa/carga quando submetidos a condições específicas de um campo elétrico e/ou magnético (CROFT et al., 2015).

O sucesso da técnica de CLAE-EM (Figura 5) surge a partir da sua capacidade para se obter dados tridimensionais. Em primeiro lugar, os compostos são separados no tempo por cromatografia, em seguida os iões gerados na fonte de ionização são então separados segundo as suas razões m/z no analisador de massa. Finalmente, o detector EM mede a abundância de cada ião. (LANÇAS F. M., 2013; WEI SUNA et al., 2015).

Durante os últimos 15 anos o acoplamentos da cromatografia líquida com a espectrometria de massa evoluiu em uma técnica aplicada rotineiramente encontrando cada vez mais o uso em laboratórios em análise de rotina. Isto tornou-se possível em grande parte devido ao advento dos métodos de ionização a pressão atmosférica (ANNELI KRUIVE, 2015).

Devido a sua amplitude de aplicações como: análise de impureza, identificação de metabólito, análise em matriz complexas, análise rápida de droga descoberta, entre outras; colocando a cromatografia líquida acoplada com o método de espectrometria de massa como uma das principais escolhas para análise (TOYO'OKA, 2008).

Na análises de matrizes complexas a cromatografia líquida acoplada com o método de espectrometria de massa pode ser considerada a técnica de maior impacto apresentada nesses últimos anos (WANG et al., 2014). Um dos avanços obtido por esta técnica foi a utilização de diferentes formas de ionização permitindo o desenvolvimento de vários métodos que torna possível a análise de diferentes compostos em complexas matrizes biológicas como o plasma sanguíneo. (AGNESOD et al, 2013;. VIJAYA BHASKAR et al., 2013.; XIONG et al., 2013).

Outra vantagem sobre outras técnicas é que analitos em níveis baixos pode ser determinado com sucesso em matrizes complexas. Provando ,desta forma, ser a técnica analítica de escolha para a maioria dos ensaios utilizados em vários estágios de descoberta de novas drogas (Anneli Kruve et al., 2015; Wang et al., 2014).

O acoplamento entre estas duas técnicas vem sendo cada vez mais reconhecida e utilizada. Tornando-se uma ferramenta analítica poderosa e tecnicamente versátil. Agregando um grande potencial na análise qualitativa e quantitativa das amostras biológicas devido: à seletividade, sensibilidade e robustez (LANÇAS F. M., 2013; WEI SUNA et al., 2015). O que comprova a utilidade desta técnica em uma vasta gama de aplicações com: testes bioanalíticos, ambiental e pesquisa farmacêutica. (Agnesod et al, 2013;. Vijaya Bhaskar et al., 2013.; Xiong et al., 2013).

A hifenação das técnicas CLAE-EM ampliam a superioridade sobre a sensibilidade, seletividade e precisão mesmo em amostras de baixa

concentração nível, tornando-a uma técnica de escolha atrativa para análises biológicas (ASIMAKOPOULOS et al. 2012).

No entanto, mesmo sendo uma técnica de alta eficiência de separação e detecção, são necessários métodos adequados de preparo de amostra antes da análise. Neste sentido, a escolha da tríade, preparo-separação-detecção são essenciais para o sucesso do método analítico (LANÇAS, 2012).

3.5. Métodos de extração em matriz biológica

O plasma é frequentemente utilizado como uma matriz biológica, uma vez que é fácil a sua coleta e utilização. Tipicamente, ele é amplamente utilizado em estudos de desenvolvimento e validação do método analítico, pouco antes dos testes em animais, trazendo uma via confiável e segura para a metodologia a ser desenvolvida. (AISHAMMARI et al., 2015).

A análise de compostos encontrados em fluidos biológicos está presente em diversas áreas de interesse como: farmacêutica, análises clínicas, medicina legal, etc. A análise cromatográfica de substâncias presentes nestes tipos de matrizes (soro, plasma, urina, etc), em geral, requer um pré-tratamento da amostra. (OLIVEIRA et al., 2007; SONIA et al., 2000).

Apreparação da amostra apropriada é essencial para a obtenção de resultados confiáveis e significativos (AISHAMMARI et al., 2015). As razões para isso são inúmeras, destacando-se a eliminação prévia de parte dos componentes devido à complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas, podendo ser adsorvidas nas colunas ou nos capilares e a concentração das substâncias a serem analisadas, geralmente presentes em nível de traços (OLIVEIRA et al., 2007)

Para as matrizes convencionais, como soro, plasma e sangue total quatro principais técnicas de amostra pré-tratamento são descritas: extração líquido-líquido (LLE), de extração em fase sólida (SPE), precipitação de proteínas (PP) e injeção direta (PATTEET, 2015; YANG et al., 2015).

No entanto, para a descoberta da droga e a farmacocinética, a precipitação de proteína (PP) é o procedimento de preparação da amostra mais comum, é a abordagem mais simples, removendo a maioria da proteína a partir

da amostra utilizando solventes orgânicos miscíveis (normalmente acetonitrila ou metanol) é o método de preparação de amostra mais comumente usado por causa do seu baixo custo e requisitos mínimos de desenvolvimento do método (AISHAMMARI et al., 2015).

A precipitação por proteínas é frequentemente utilizada como uma amostra simples e rápido de limpeza para evitar complexo pré-tratamento de amostras para fins de LC. Uma vez que se sabe que nem todos os componentes de matriz são eliminados por PP, efeitos de matriz tem que ser investigado completamente quando se utiliza técnicas de espectrometria de massa. (YANG et al., 2015).

Moléculas originadas da mesma matriz da amostra, que co-eluem com o analito de interesse, podem interferir no processo de ionização na espectrometria de massas, causando supressão ou indução da ionização. Esse fenômeno é chamado de efeito matriz, o que pode limitar o uso de métodos bioanalíticos com detecção por espectrometria de massas. Portanto, uma avaliação da presença de efeito matriz deve ser incluída no processo de validação, embora muitas vezes seja negligenciada (MIRANDA et al., 2013).

A investigação do efeito de matriz durante a quantificação de compostos endógenos ou exógenos e/ou seus metabólitos é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse, sendo alvo de especulação em métodos bioanalíticos convencionais, tais como: CLAE/FLU, CLAEUV, CLAE/EC e mais recentemente em CLAE-MS (MATUSZEWSKI et al., 2003; CASSIANO et al., 2009).

A elevada seletividade e especificidade da CLAE-EM quando na presença de matrizes biológicas, apresenta-se propenso a erros, uma vez que a presença de substâncias não monitoradas e que coeluem da matriz podem afetar a detecção dos analitos comprometendo a eficiência de ionização dos mesmos, caracterizando assim o efeito de matriz (CASSIANO et al., 2009)

O efeito matriz foi primeiramente descrito por Tang e Kiehl, 1991 em pesquisas que mostravam que a resposta para bases orgânicas em uma determinada matriz, utilizando a fonte de ionização *electrospray*, diminuiu à medida que a concentração de outras bases orgânicas foi aumentada. O

mecanismo exato do efeito de matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado (TAYLOR et al., 2005; CASSIANO et al., 2009).

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DA RIPARINA I

Caracterização do Estado Sólido da Riparina I.

1. Introdução

A caracterização do estado sólido de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) influenciam vários elos da cadeia da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, devido à sua implicação em termos das propriedades físico-química e biofarmacêutica tais como solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade e estabilidade (RAW et al, 2004; BERNARDI et al, 2013).

As matérias-primas farmacêuticas podem ser classificadas como sólidos cristalino ou amorfos. Os sólidos cristalinos têm arranjos moleculares espaciais regulares que se repetem ao longo da rede cristalina, diferenças na periodicidade desses arranjos resultam em diferentes propriedades físicas e químicas dos cristais em comparação com os sólidos amorfos. Assim, a maior compreensão do estado sólido de um IFA asseguram o controle das propriedades indesejadas impedindo a entrega de matérias-primas problemáticas ao mercado (GONNELLA, 2010).

A eficácia terapêutica dos fármacos está diretamente relacionada às suas características estruturais cristalinas (polimorfismo), ao hábito cristalino (morfologia) e ao tamanho de partícula. A identificação, caracterização e controle eficiente das formas sólidas de um fármaco é conhecimento estratégico para garantir a qualidade e segurança dos medicamentos, proteger a propriedade intelectual e efeitos regulamentares (CARINI et al, 2009; SYKULA-ZAJA et al, 2011).

Alterações ocorridas nas características dos cristais podem refletir na intensidade do efeito esperado do medicamento, devido à alteração da

extensão e velocidade de absorção do fármaco, podendo resultar em falhas terapêuticas, aumento na toxicidade e no surgimento eventos adverso (LIN, 2015).

A possibilidade de ocorrer transformações morfológicas do cristal do fármaco formando outras formas estáveis, metaestáveis, pseudo-polimórficas, amorfas, entre outras, deve ser levada em consideração durante as etapas de cristalização e purificação. Do ponto de vista tecnológico é primordial que se desenvolvam métodos analíticos de controle da metodologia de síntese a fim de se garantir a reprodutibilidade lote a lote do IFA avaliando essas características (LLINAS & GOODMAN, 2008).

O controle das impurezas advindas do processo de obtenção de IFA é crítico no fornecimento de um fármaco de alta qualidade. Além disso, a segurança de um produto é dependente não só das propriedades toxicológicas da substância ativa, mas também sobre as impurezas que ela possa conter. Portanto, a determinação e controle de impurezas relacionadas ao IFA torna-se parte importante do desenvolvimento e avaliação da qualidade da síntese, já que fatores como rotas de síntese, condições da reação, qualidade do produto de partida, reagentes e solventes e etapas de purificação podem influenciar na natureza e quantidade de impurezas no produto final (SANTOS et al, 2015).

Devido à complexidade da análise do estado sólido várias técnicas analíticas tem sido utilizadas em conjunto de modo complementar na caracterização do estado sólido de matérias-primas farmacêuticas, na identificação de polimorfismo e suas diferentes formas cristalinas e impurezas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a difração de raio-X (DRX), a ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMN) no estado sólido, a espectroscopia no infravermelho (IR) e as técnicas térmicas termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (BORGHETTI et al, 2012, GUO, SHALAEV & SMITH, 2013).

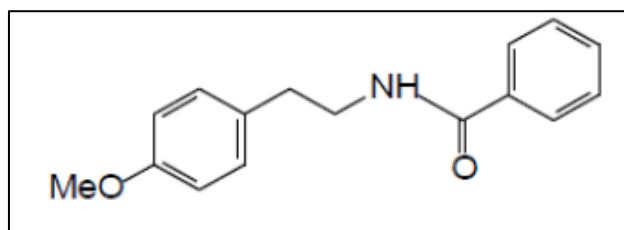
A riparina I, N-benzoiltiramina, apresenta fórmula molecular observada na Figura 1, é uma alcaloide isolada dos frutos verdes de *Aniba riparia* (Neez) Mez, sintetizada pela primeira vez por Barbosa et al (1999), apresenta várias atividades farmacológicas, entre as quais ação antinociceptiva, ansiolítica e antimicrobiana (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009;

CATÃO, et al., 2010; LEITE et al., 2011; SOUSA et al., 2011.) A síntese da riparina I consiste em um processo de uma única etapa com bom rendimento.

Apesar da riparina I apresentar-se como molécula promissora devido ao potencial farmacológico não existe relatos na literatura sobre as características do estado sólido da matéria-prima e suas implicações biofarmacêuticas fundamentais a um candidato a fármaco.

Este trabalho tem como objetivo a caracterização de 5 lotes da matéria-prima riparina I através de diferentes técnicas analíticas como DSC, TG, pirólise acoplada ao CG/EM, IV, MEV, DRX e RMN de ^1H e ^{13}C de líquidos, com intuito de fornecer informações sobre as propriedades físico-químicas da Riparina I, com foco no controle de qualidade da tecnologia de síntese.

Figura 1. Estrutura da Riparina I



2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Foram utilizados cinco lotes da matéria-prima Riparina I, obtidos pelo mesmo processo de síntese, fornecidas pelo Prof. Dr. Stanley Juan Chavéz Gutierre, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), nomeados RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5.

Os solventes utilizados foram água ultra pura Milli-Q obtido da Opition-Q Labwater System Purelab (Elga, São Paulo, Brasil) e solvente acetonitrila (ACN) grau HPLC obtido da TEDIA (São Paulo, Brasil) e clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Cambridge Isotope Laboratories).

2.2. Avaliação do perfil de impurezas

2.2.1. Determinação do Teor

O teor dos lotes de riparina I foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo o método para avaliação da estabilidade da Riparina I, de Queiroga, 2010. Foi utilizado um sistema cromatográfico Shimadzu (Série Prominence) equipado com um sistema de bombas binário (LC-20AD), sistema de injeção automático (SIL-20A), um sistema de degaseificação (DGU-20A₃) e um detector UV-VIS com arranjo de diodos (SPD-M10A). A coluna utilizada foi uma Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 3,9 mm ID, com partículas de 5 µm). Foi utilizada também uma pré-coluna SecurityGuard Gemini C18 (4 mm x 3.0 mm ID) adquirida da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR). A fase móvel consistiu de mistura H₂O:ACN (65/35, V/V). O volume de injeção foi de 20 µL, a velocidade de fluxo da fase móvel foi mantida constante a 1,0 mL/min e a detecção efetuada por espectrofotometria eletrônica no ultravioleta em comprimento de onda de 254 nm. O software LC Solution[®] (Shimadzu, Japão) foi usado para controlar o equipamento na aquisição e análise dos dados. As amostras foram preparadas na concentração de 100 µg.mL⁻¹.

2.2.2. Análise do perfil de impurezas

As impurezas foram avaliadas utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Utilizando o mesmo sistema e método analítico para a determinação do teor. Foram pesadas amostras de 1 mg dissolvidas em ACN e realizadas diluições para obtenção de amostras com concentração de 100 µg.mL⁻¹.

2.3. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM MHz da Unidade de Caracterização e Análise (UNICAL) do IPERFAM-UFPB. Os lotes foram dissolvidos em clorofórmio deuterado CDCl_3 na concentração de 3 mg/0,6mL.

2.4. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

O espectro de IV dos lotes da riparina I (RIP1-5) foram obtidos em pastilha de brometo de potássio. Essas foram preparadas com 100mg de KBr e 1mg da amostra, após a homogeneização em grau os pós, a mistura foi prensada a 9Kg/ton por 3 minutos sobre à vácuo. A pastilha formada foi analisada em um espectrofotômetro modelo de sistema Shimadzu IRPrestige-21 ao longo de um intervalo de 400-4,000 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram analisados no programa IR-solutions da Shimadzu.

2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise foi realizada em microscopia eletrônica sob alto vácuo, as amostras foram banhadas com ouro. A análise das amostras realizada por microscopia eletrônica de varredura foi efetuada com aumentos de 75, 300, 500 e 1000 x.

2.6. Estudos termoanalíticos

2.6.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas calorimétricas foram obtidas em um calorímetro de varredura diferencial (Shimadzu, modelo DSC-50) utilizando como porta amostra um porta amostra fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado utilizando índio ($156,6 \pm 0,3$ °C) como padrão. O sinal de fluxo de calor foi calibrado pelo calor de fusão do índio ($28,59 \pm 0,3$ J/g). Os experimentos foram conduzidos com elevação da temperatura no intervalo de 25-400 °C nas razões de aquecimento de 2, 5, 10, 20 e 40 °C/min para os lotes de riparina I, em fluxo de

nitrogênio de 50 mL/min. A massa da amostra foi de $2,0 \pm 0,1$ mg. Os dados DSC foram analisados utilizando o Software Tasys[®] da Shimadzu.

2.6.2. DSC acoplado a Sistema fotovisual (DSC-fotovisual)

Os dados DSC-Fotovisual foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC-50) acoplado a um sistema fotovisual, equipado com um microscópio (Olympus, modelo SZ-CTV60) e uma câmera (Sony, modelo VCC-520). As amostras foram colocadas em um porta amostra aberto de alumínio e aquecidas no intervalo de temperatura de 25-400 ° C com taxa de aquecimento de 10 ° C/min, nas mesmas condições de fluxo de nitrogênio do DSC convencional. As fotos foram capturadas com o Software Asymetrix DVP 4,0 em tempo real para observar as transições de fase nas amostras.

2.6.3. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas para os lotes RIP1-5 foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu, modelo TGA-50) utilizando porta amostra de alumina aberto. O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25-900 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min em ar sintético e nitrogênio com fluxo de 20 e 50 mL/min, respectivamente. Para os comprimidos foram utilizadas as razões de 10, 20 e 40 °C/min. A massa da amostra foi de $3,2 \pm 0,1$ mg. Os dados obtidos a partir dos comprimidos foram utilizados para determinação da energia de ativação (E_a) utilizando o modelo de Ozawa para os dados de TG dinâmica em atmosfera de ar sintético e nitrogênio. Os dados termogravimétricos foram analisados utilizando o Software Tasys[®] da Shimadzu.

2.7. Pirólise Acoplada a CG-EM

Para os estudos de pirólise foi utilizado um pirolisador acoplado a um cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu, GCMS-QP5050A) diretamente

interfaciado com um espectrômetro de massas. Coluna capilar com fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de tamanho de partícula. O forno foi operado com a seguinte programação de temperatura: 70 °C (inicial) e a uma razão 10 °C/min até 280 °C, o hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min, com razão de split de 1:10. A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massas de 40 a 450 u.m.a. A temperatura da fonte de íons foi de 300°C. A identificação dos compostos foi realizada comparando seus espectros de massas com os espectros existentes no banco de dados da biblioteca Wiley/NBS. O volume de amostra corresponde a um pequeno cristal que foi colocado em um cadinho de platina e introduzido no pirolisador nas temperaturas de 250°C e 500°C, separadamente para cada experimento.

2.8. Difração de raio-X (DRX)

Padrões de difração dos lotes de riparina I RIP1-5 foram analisadas usando um modelo D2 PHASER da Bruker (geometria de CuK α , θ -2 θ , 40 KV-30 mA, tamanho 0,02°2 θ -2°2 θ). As intensidades de difração foram medidas entre ângulos Bragg (2 θ) de 5 a 35°.

2.9. Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (¹³C-RMN)

Os espectros de ¹³C RMN do estado sólido para os lotes de riparina I (RIP1-5) foram obtidos num espectrômetro Bruker, modelo DSX 300 ¹³C, utilizando frequência de ressonância de 75,47 MHz. aproximadamente 400 mg da amostra foi empacotada em um rotor de zircônia de 4 mm de diâmetro externo, com auxílio de um suporte em formato de funil e um pistão. O equipamento é equipado com uma sonda (narrow bore) para rotores e giro no ângulo mágico. Os rotores utilizados podem ser girados em rotações máximas de 15 kHz e, permite a realização de experimentos com variação controlada de temperatura.

3. Resultados e Discussão

A combinação de várias técnicas analíticas vem sendo muito utilizada na caracterização do estado sólido de fármacos na determinação de impurezas, polimorfos, pseudopolimorfos e no controle da reprodutibilidade da síntese no desenvolvimento de novos fármacos (SANTOS et al, 2015; BORGHETTI et al, 2012; GUO, SHALAEV & SMITH, 2013).

É imperativo a determinação de parâmetros e especificações do estado sólido dos fármacos, para a avaliação do controle de qualidade no desenvolvimento tecnológico de medicamentos, sendo o controle destas propriedades de fato uma preocupação para a indústria farmacêutica (LIN, 2015).

3.1. Avaliação do Perfil de impurezas

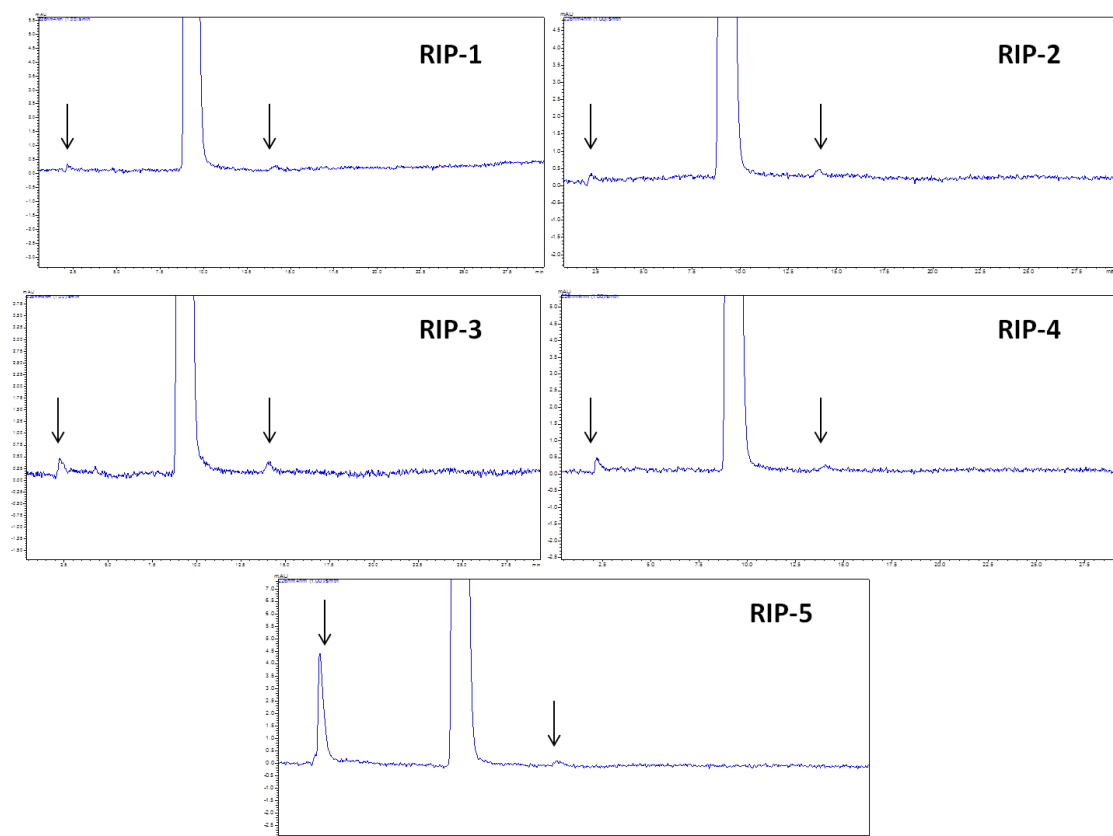
3.1.1. Teor da Riparina I e Perfil de impureza

O teor de riparina I nos lotes RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5 foram: $99,34 \pm 0,13$, $98,95 \pm 0,67$, $98,9 \pm 0,86$, $99,55 \pm 0,34$ e $98,95 \pm 0,43\%$, respectivamente.

Na análise do perfil cromatográfico dos 5 lotes analisados foram encontrados picos referentes as impurezas apresentadas nos cromatogramas na Figura 1. O nível de impurezas totais, permitido comumente, deve ser menor do que 1,0%, e para as substâncias individuais os níveis desejáveis correspondem as quantidades de 0,05-0,1% (dependendo da dose diária máxima) (SANTOS, 2015). O lote RIP-5 apresentou pico em tempo de retenção em 2,5 min de maior intensidade quando comparado aos outros lotes. No entanto, nenhum dos picos cromatográficos apresentou valores percentuais de áreas maiores que 1,0% em relação ao pico da riparina I, nem picos diferentes entre os lotes.

A presença de impurezas pode ser resultado de fatores relacionados a síntese e condições de reação, resultados em alterações no hábito cristalino, e consequentemente com diferentes propriedades do estado sólido como fluidez, dissolução, densidade aparente e compactação (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013).

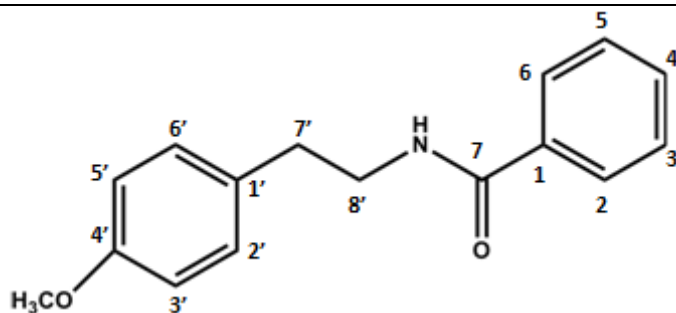
Figura 1. Perfil cromatográfico de impurezas dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5.



3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os dados dos deslocamentos químicos e sinais dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C confirmaram a estrutura química da riparina I em comparação aos dados da literatura (SEIXAS, 1996) (Tabela 1). No espectro de RMN de ^1H (Figura 2), devido a maior sensibilidade da técnica, foi possível observar a presença de impurezas nos lotes RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP5, mostrando que o lote RIP-1, considerando a sensibilidade da técnica analítica, é a amostra mais pura. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3), observa-se os mesmos sinais de carbono para a riparina I nos 5 lotes.

Tabela 1. Comparação dos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio e carbono da riparina I com a literatura.



	* δ_C	* δ_H	δ_C	δ_H
1	134,6	-	134,6	-
2	127,9	7,56	127,9	7,54
3	126,9	7,32	126,7	7,33
4	131,2	7,54	131,3	7,55
5	126,6	7,32	126,7	7,31
6	128,3	7,60	128,5	7,63
7	167,4	-	167,4	-
1'	130,8	-	130,8	-
2'	129,2	7,12	129,7	7,12
3'	114,0	6,85	114,1	6,85
4'	158,1	-	158,3	-
5'	114,0	6,84	114,1	6,84
6'	129,8	7,12	129,8	7,12
7'	34,6	2,84	34,8	2,83
8'	41,2	3,66	41,3	3,66
N-H	-	6,18	-	6,18
CH ₃ O	55,9	3,56	52,2	3,56

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5, em CDCl_3 .

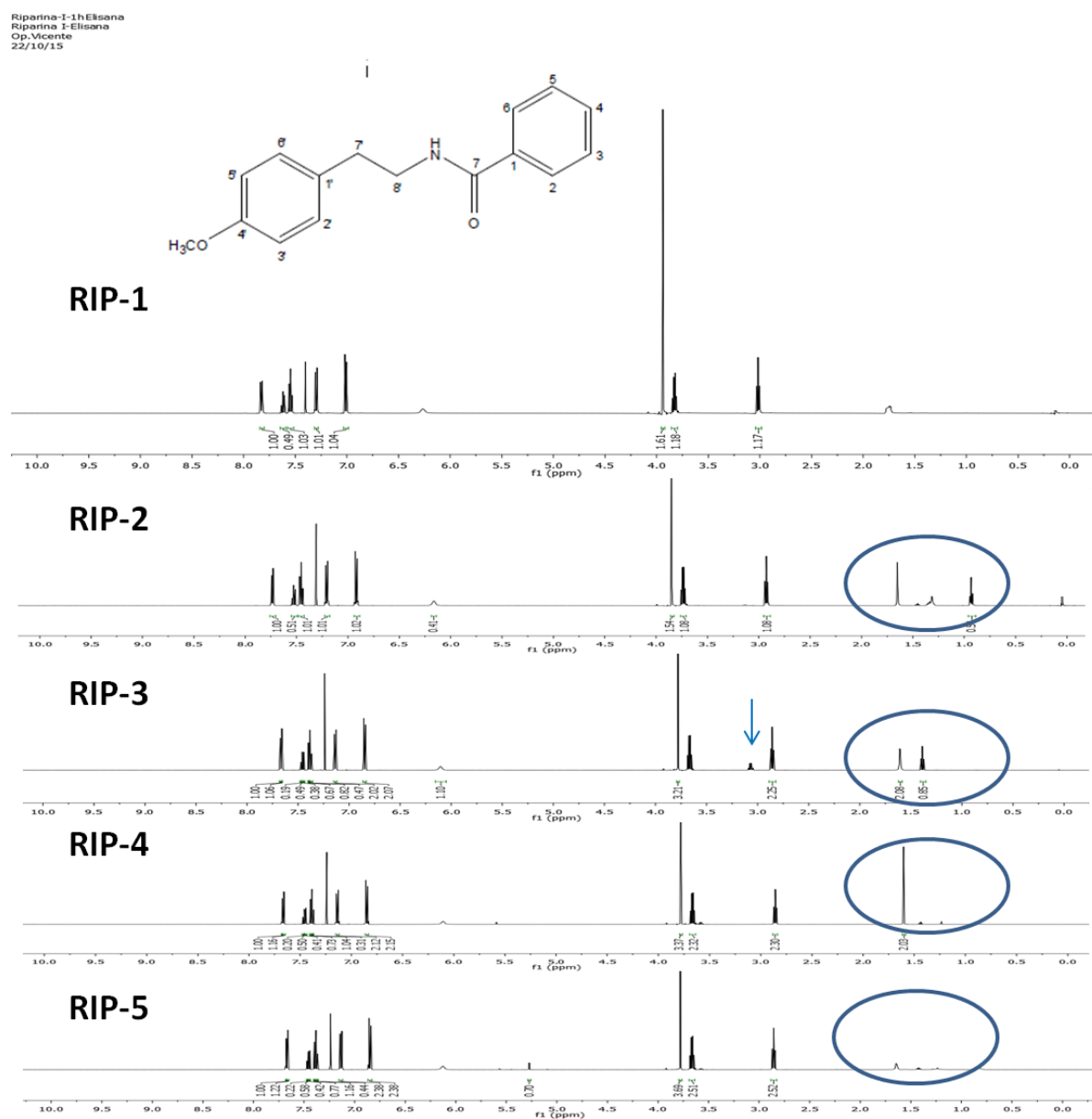
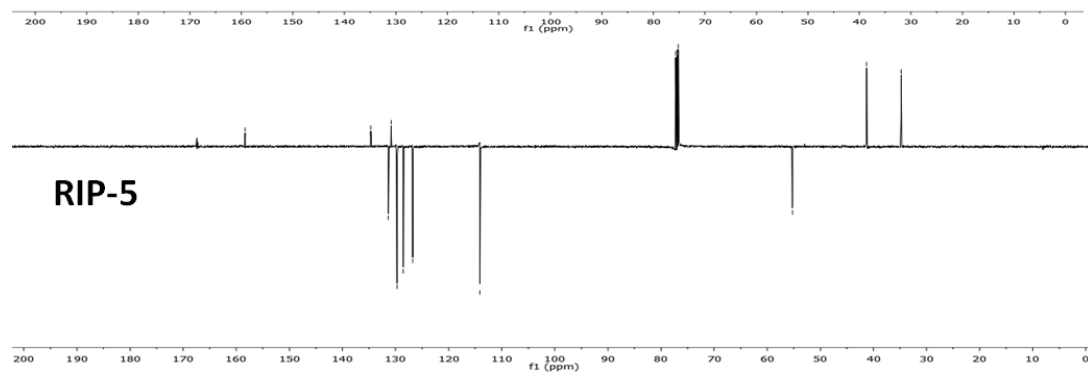
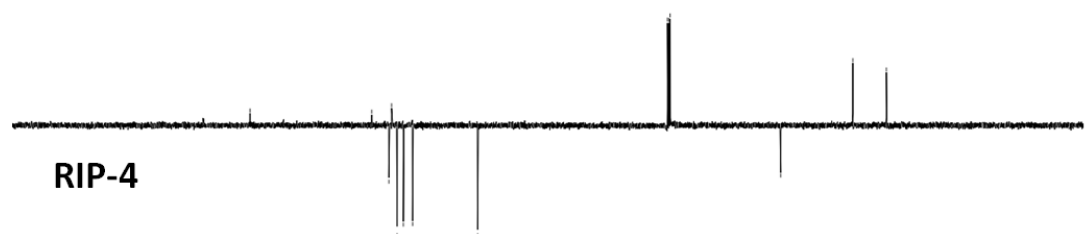
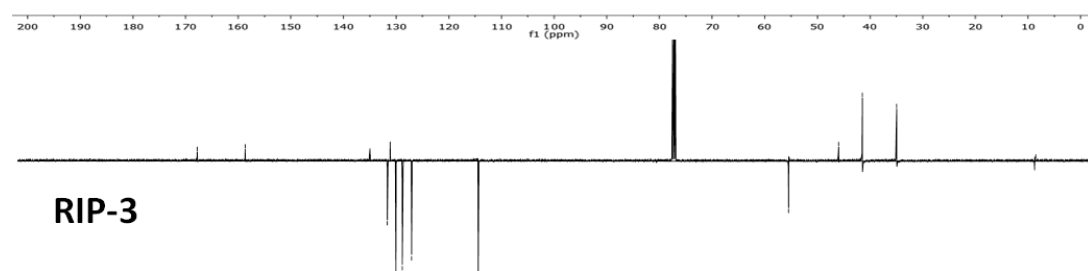
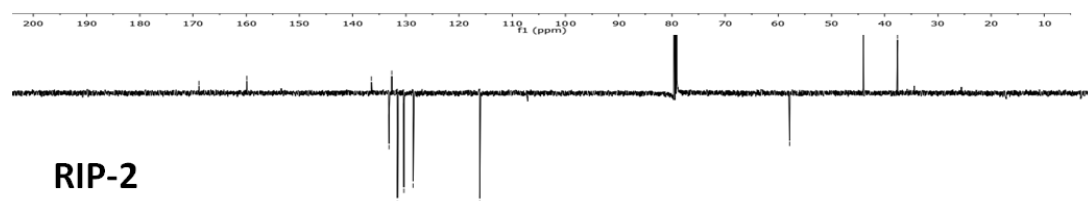
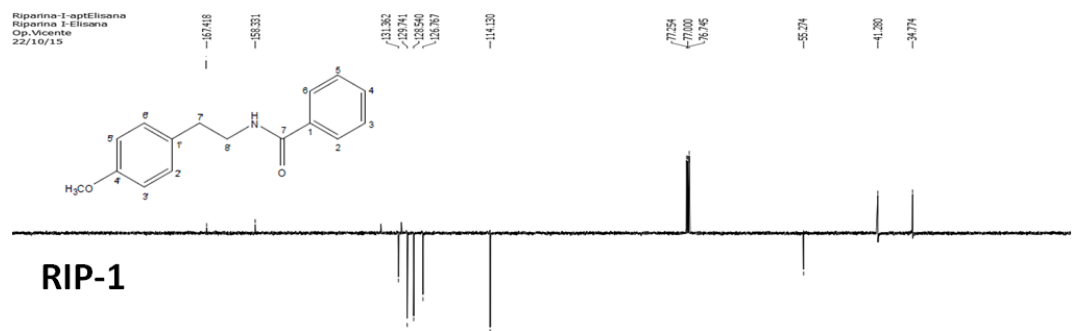


Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C dos cinco lotes de riparina RIP-1, RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5, em CDCl_3 .

Riparina-1-Eptilisena
Riparina-1-Etisena
Op. Vicente
22/10/15



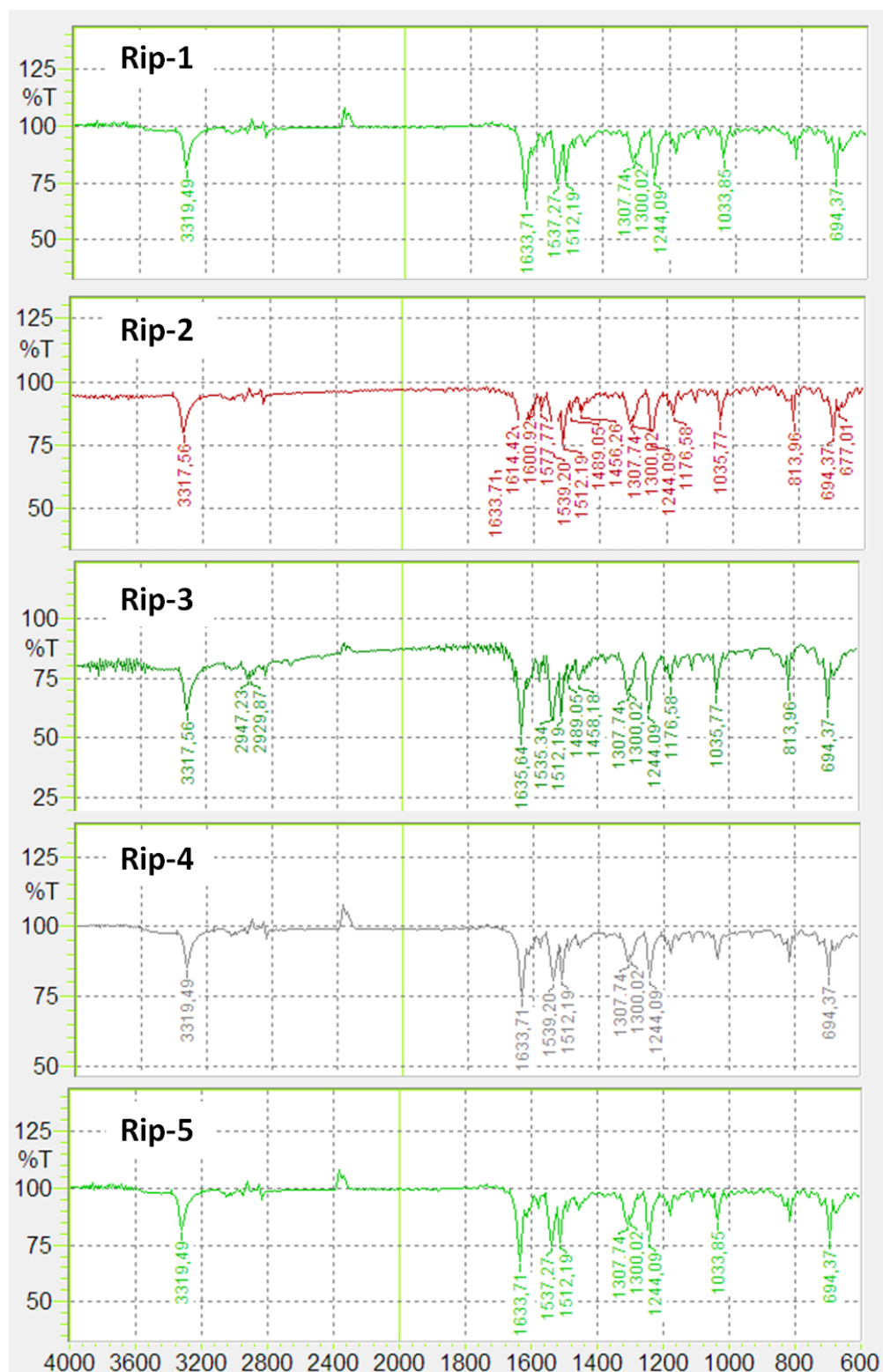
3.3. Espectroscopia no Infravermelho

Através das análises da espectroscopia vibracional do infravermelho é possível obter respostas baseadas na vibração de moléculas específicas, sendo possível a caracterização de hidratos, solvatos e diferentes formas cristalinas (PAIVA et al, 2010). A figura 4 mostra os espectros de infravermelho obtidos para as amostras RIP-1-5. As bandas de absorção característicos da riparina I no espectro de IV são, N-H em 3319 cm^{-1} , C=O em 1639 e estiramento C=C de aromático em 1535 e 1512 (QUEIROGA, 2010). Os resultados dos espectros confirmaram a presença dos grupos funcionais característicos da molécula da riparina I para todos os lotes, além de deslocamentos químicos para estes grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados dos espectros de infravermelho dos lotes da Rip-1.

Lotes	N-H	C=O u (cm^{-1})	-C=C	
Rip-1	3317,49	1633,71	1537,27	1512,19
Rip-2	3319,56	1633,71	1539,21	1512,19
Rip-3	3319,56	1635,64	1535,34	1512,19
Rip-4	3317,49	1633,71	1539,21	1512,19
Rip-5	3317,49	1633,71	1537,27	1512,19

Figura 4. Espectros de absorção IV dos lotes de Rip 1-5.



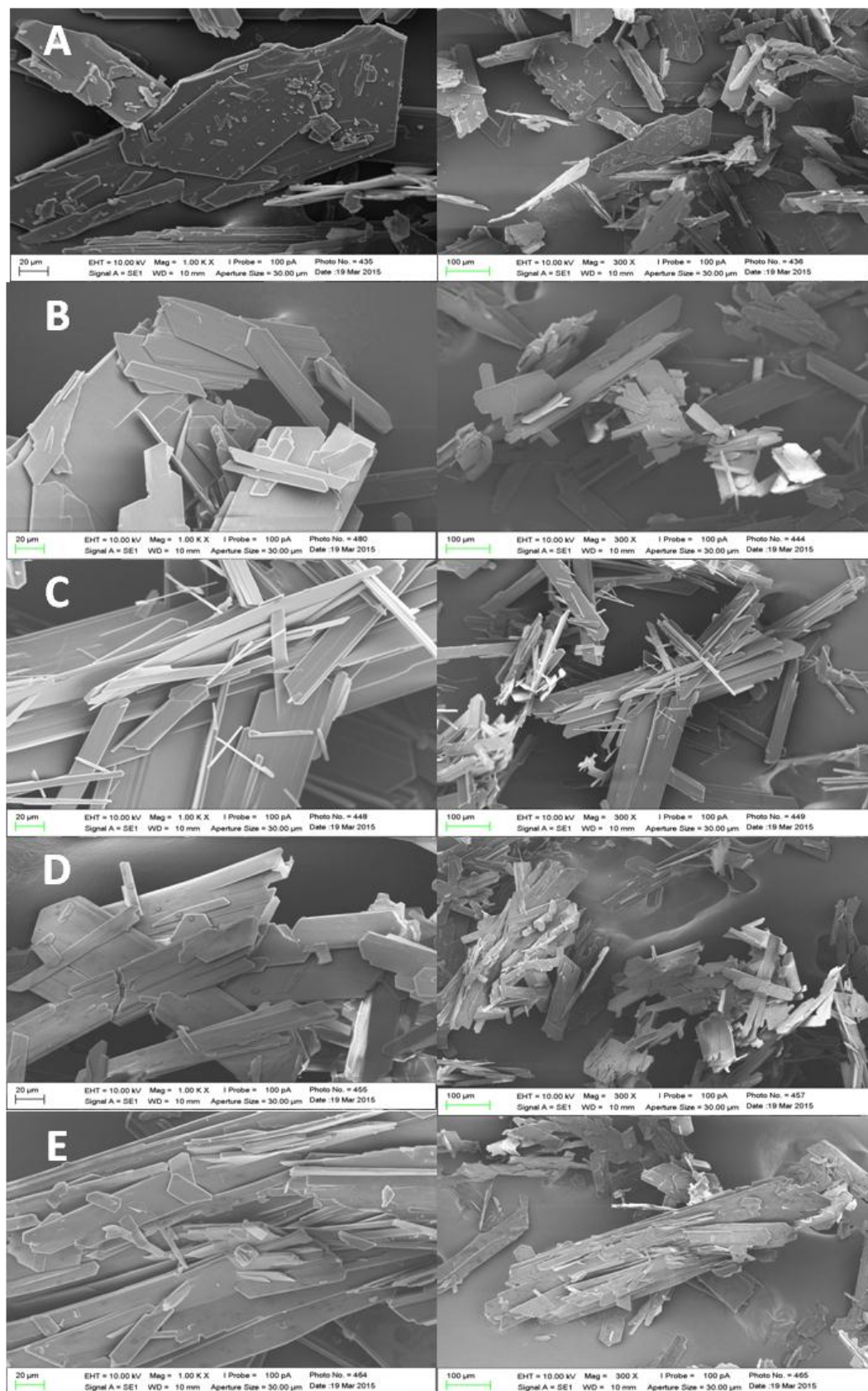
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Durante a cristalização de uma substância, fatores como alterações de temperatura, umidade e efeitos mecânicos (condições de obtenção) podem induzir a formação de um cristal com hábito cristalinos distintos. A morfologia cristalina desempenha um papel importante no processamento de produtos farmacêuticos e para o desenvolvimento de formas de dosagem sólidas. Diferenças na hábito de cristal pode influenciar fortemente a orientação das partículas e modificar a capacidade de fluxo, embalagem, compactação, compressão e características de dissolução (BERNARDI et al, 2013). A observação de diferentes hábitos cristalinos de um mesmo composto, no entanto, não necessariamente significa que se trata de polimorfos diferentes (ARAUJO et al, 2012).

A morfologia e o hábito cristalino dos lotes de riparina RIP1-5 foram estudados por MEV (Figura 5). Os lotes apresentam cristais com aspecto de sobreposição de placas laminar não ordenadas com superfície irregular apresentando fragmentos de cristais e partículas irregulares (com tamanho de partícula e frequência dos agregados variando entre as amostras). O lote Rip-1 (Figura 5-A) apresentou placas com bordas largas, com fragmentos de partículas menores na superfície. O lote RIP-2 (Figura 5-B) e RIP-4 (Figura 5-D) apresentaram placas maiores com bordas mais afiladas. O lote RIP-3 (Figura 5-C), apresentou claramente fragmentos de cristais bem definidos em forma acicular (agulhas) misturados sobre às placas não ordenadas apresentando bordas mais afiladas. O lote RIP-5 (Figura 5-E) apresentou placas com maior tendência a aglomerados.

Os resultados do MEV evidenciam hábitos cristalinos diferentes podendo ter implicações nas propriedades físico-químicas e mecânicas.

Figura 5. Imagens obtidas pó espectrometria eletrônica de varredura (MEV) dos lotes de riparina RIP 1-5.



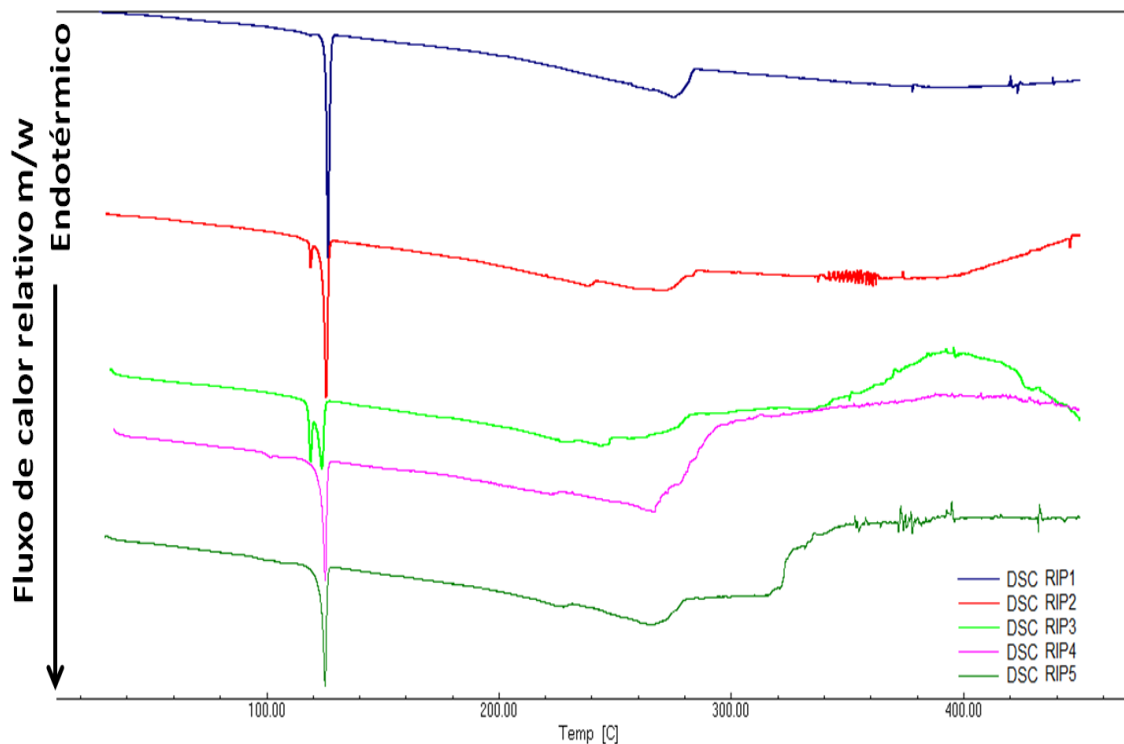
3.5. Análise Térmica

A análise térmica é uma das mais importantes técnicas analíticas na caracterização de estruturas cristalina de fármacos, sendo amplamente utilizada na identificação de polimorfos, solvatos e hidratos (LÁNG, 2015).

3.5.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os dados DSC são frequentemente utilizado para os estudos de sólidos cristalinos, já que diferentes formas polimórficas diferem nos seus pontos de fusão (DEKKER, 1999). A ocorrência de múltiplos picos quando uma forma é aquecida pode indicar a transição cristalina de uma forma polimórfica (BOTTOM, 1999). A razão de aquecimento pode ter uma grande influência sobre a cinética e a resolução dos picos das curvas DSC (GIRON, 1995). As curvas DSC dos lotes de riparina RIP1-5 foram melhor caracterizados na razão de aquecimento de 2 °C/min (Figura 6).

Figura 6. Curvas calorimétricas na razão de aquecimentos de 2 °C/min dos lotes de riparina RIP1-5.



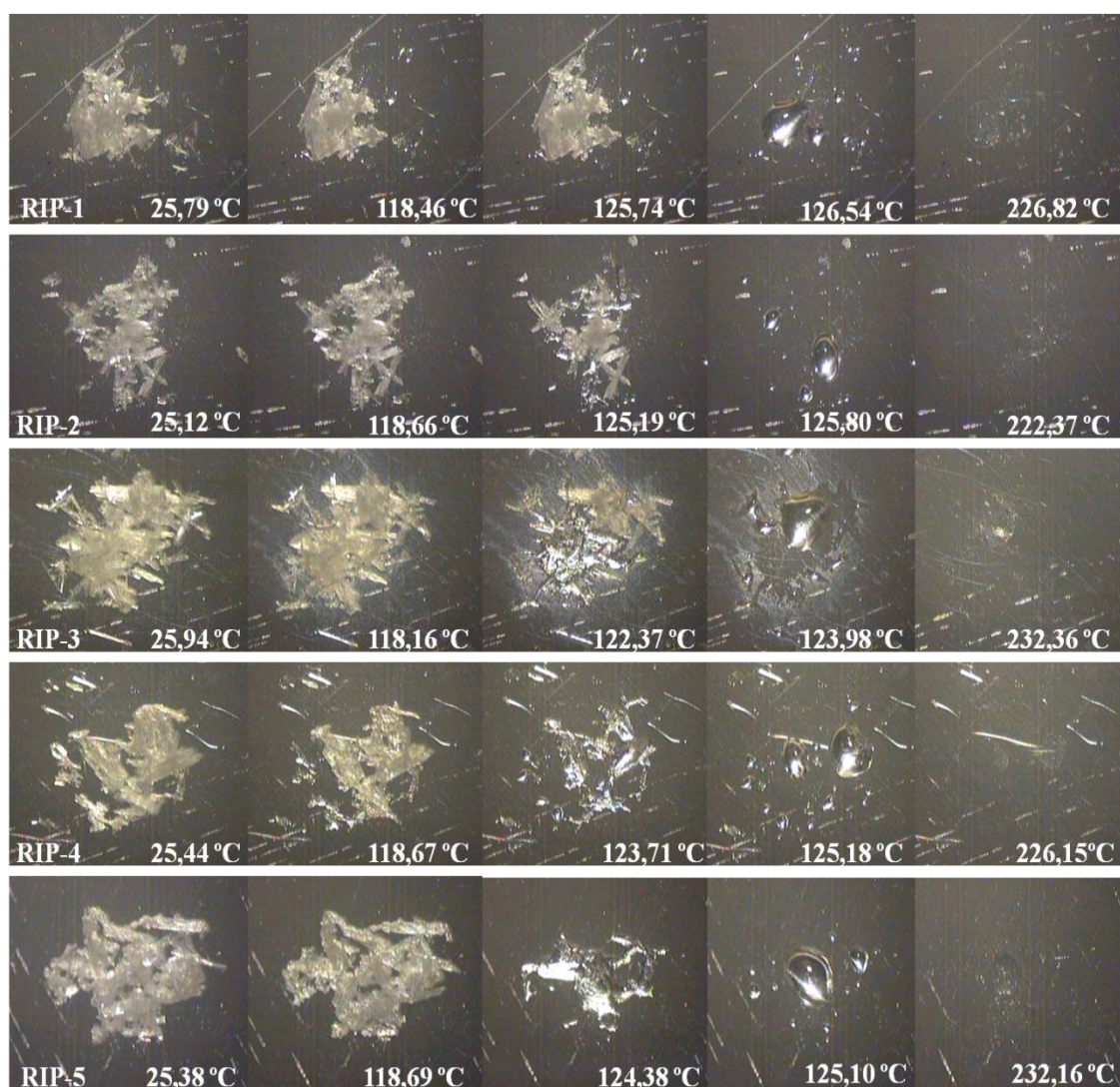
Foi observado um comportamento térmico diferente para os lotes de riparina I. Os dados térmicos para o lote RIP-1 revelam a existência de uma transição de fase endotérmica na temperatura de 125,74 °C com calor de entalpia de -100,62 J/g, correspondente a fusão da amostra. As curvas calorimétricas dos lotes RIP-2 e RIP-3 apresentaram dois eventos endotérmicos característicos de transição de fase. Para o lote RIP-2 nas temperaturas de 118,66 e 125,19 °C e calor de entalpia de -6,14 e -80,93 J/min, respectivamente. Para o lote RIP-3 os eventos endotérmicos exibiram picos com temperaturas de 118,16 e 123,94 °C/min e entalpia de calor de -15,83 J/g e -30,25 J/g, respectivamente. A presença dois picos endotérmicos para RIP-2 e RIP-3, sugerem a presença de misturas de cristais com pontos de fusão distintos nas amostras. Os lotes RIP-4 e RIP-5 apresentaram um único pico endotérmico característico de fusão com temperaturas de 123,71 e 124,38 °C e entalpia de calor de -73,50 e -69,29 J/g, respectivamente. As diferenças nas entalpias de fusão observadas para as amostras na temperatura de fusão da riparina I sugerem a presença de impurezas e diferenças de cristalinidade (KUMINEK et al, 2013).

3.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial Acoplado ao fotovisual

Na Figura 7 estão apresentadas as imagens obtidas no DSC-Fotovisual para os lotes de riparina I, onde foi possível confirmar as diferenças nos processos de transições de fase das amostras. Nas imagens obtidas nas temperaturas em torno de 25 °C observa-se as amostras em temperatura ambiente sem alterações visíveis. Nas imagens capturadas para o lote RIP-1 observa-se a fusão na temperatura de 125,80 °C em um processo rápido e bem definido. As imagens obtidas para o processo de fusão dos lotes RIP-2 e RIP-3 apresentam-se como um processo em etapas distintas, onde parte da amostra está fundindo e a outra permanece estável. As imagens em torno da temperatura de 118 °C observamos alterações discretas para as amostras RIP-2 e RIP-3, correspondendo ao início do processo de fusão. Para o lote RIP-2 as imagens mostram na temperatura de 125,19 °C a fusão de uma parte da amostra e a outra ainda no estado sólido, fundindo completamente na temperatura de 125,80 °C. Para o lote RIP-3 o processo de fusão inicia em

temperatura mais baixa 122,37 °C onde observamos claramente parte da amostra fundida terminando a transição de fase na temperatura de 123,98 °C. As imagens sugerem que os lotes RIP-2 e RIP-3 apresentam mistura de cristais. Nas imagens da transição de fase dos lotes RIP-4 e RIP-5 observa-se um processo de fusão em uma única etapa, semelhante ao lote RIP-1, no entanto iniciam em temperaturas mais baixas. O processo de fusão é completo nas temperaturas de 125,18 °C e 125,10°C, para RIP-4 e RIP-5 respectivamente, inferiores ao lote RIP-1. Nas temperaturas de 226,8 °C, 222,37 °C, 232,26 °C, 226,15 °C e 232,16 °C observam-se nas imagens a ausência de todo o conteúdo das amostras dos lotes para estas temperaturas.

Figura 7. DSC-fotovisual dos lotes de riparina I (Lotes RIP 1-5) na razão de aquecimento de 10 °C/min.



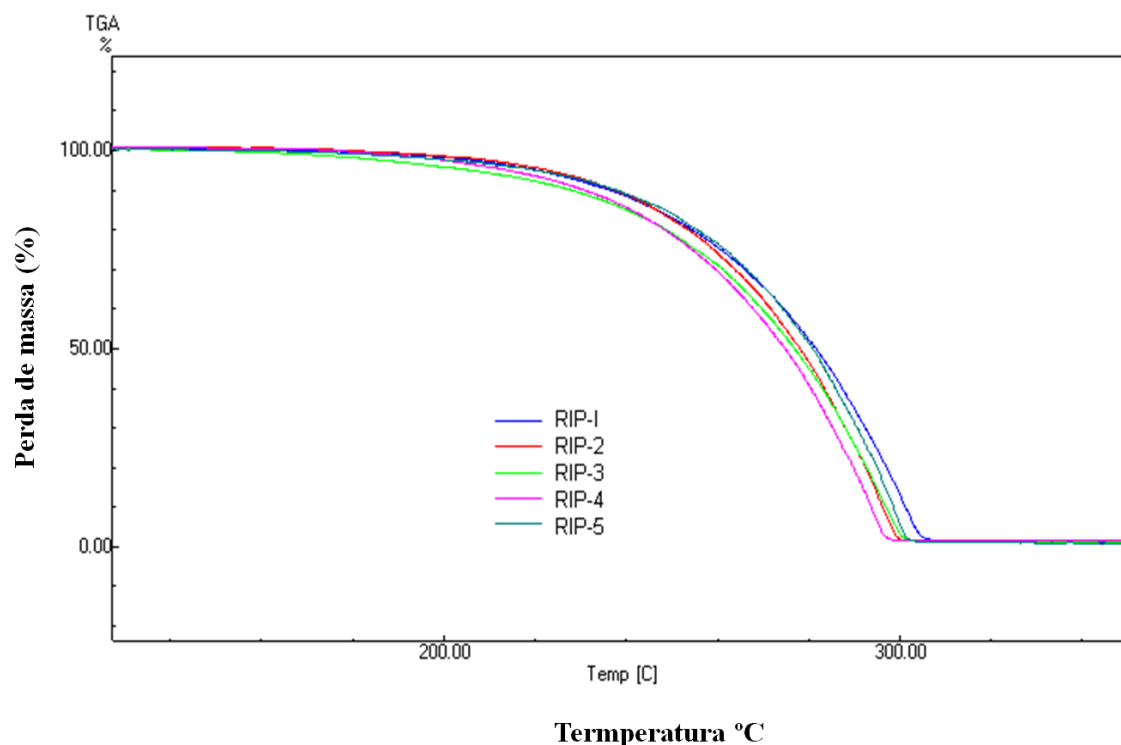
3.5.3. Termogravimetria (TG)

Na Figura 8 estão apresentadas as curvas termogravimétricas para os lotes de riparina I na razão de aquecimento de 10 °C/min. As curvas mostram perfis de TG similares em relação ao processo de decomposição térmica ocorrendo em uma única etapa em todas as amostras e razões de aquecimento estudadas. Esta observação associada as imagens no DSC fotovisual da perda de todo o conteúdo das amostras, é sugestivo de que a perda de massa ocorreu por vaporização direta da molécula da riparina I (MOURA et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011).

As curvas termogravimétricas não apresentam perda de massa na faixa de temperatura das transições de fase observadas no DSC-50 para todos os lotes, o que demonstra a ausência de solventes na estrutura cristalina, inferindo que os cristais analisados não são formas cristalinas características de solvatos ou hidratos (AGRAWAL et al, 2004; BOER et al, 2013).

O lote RIP-1 apresenta perda de massa na faixa de temperatura de 249,13 – 304,64 °C, com porcentagem de perda de massa de 99,43%; RIP -2 em 245,38 – 299,27 °C com 99,82% de perda de massa; RIP-3 na faixa de 168,37 – 300,18 °C com 98,82% de perda de massa; RIP-4 de 218,07 – 296,36 °C, com 99,87% de perda de massa e RIP-5 na faixa e perda de massa de 222,67 – 302,23 °C e 99,89 %, respectivamente. Assim, é possível inferir que as amostras apresentam estabilidades térmicas diferentes, indicando uma ordem de estabilidade térmica em que o lote RIP-3 < RIP-4 < RIP-2 < RIP-5 < Rip-1.

Figura 8. Curvas termogravimétricas dos lotes de riparina I (Lotes RIP 1-5) na razão de aquecimento de 10 °C/min.

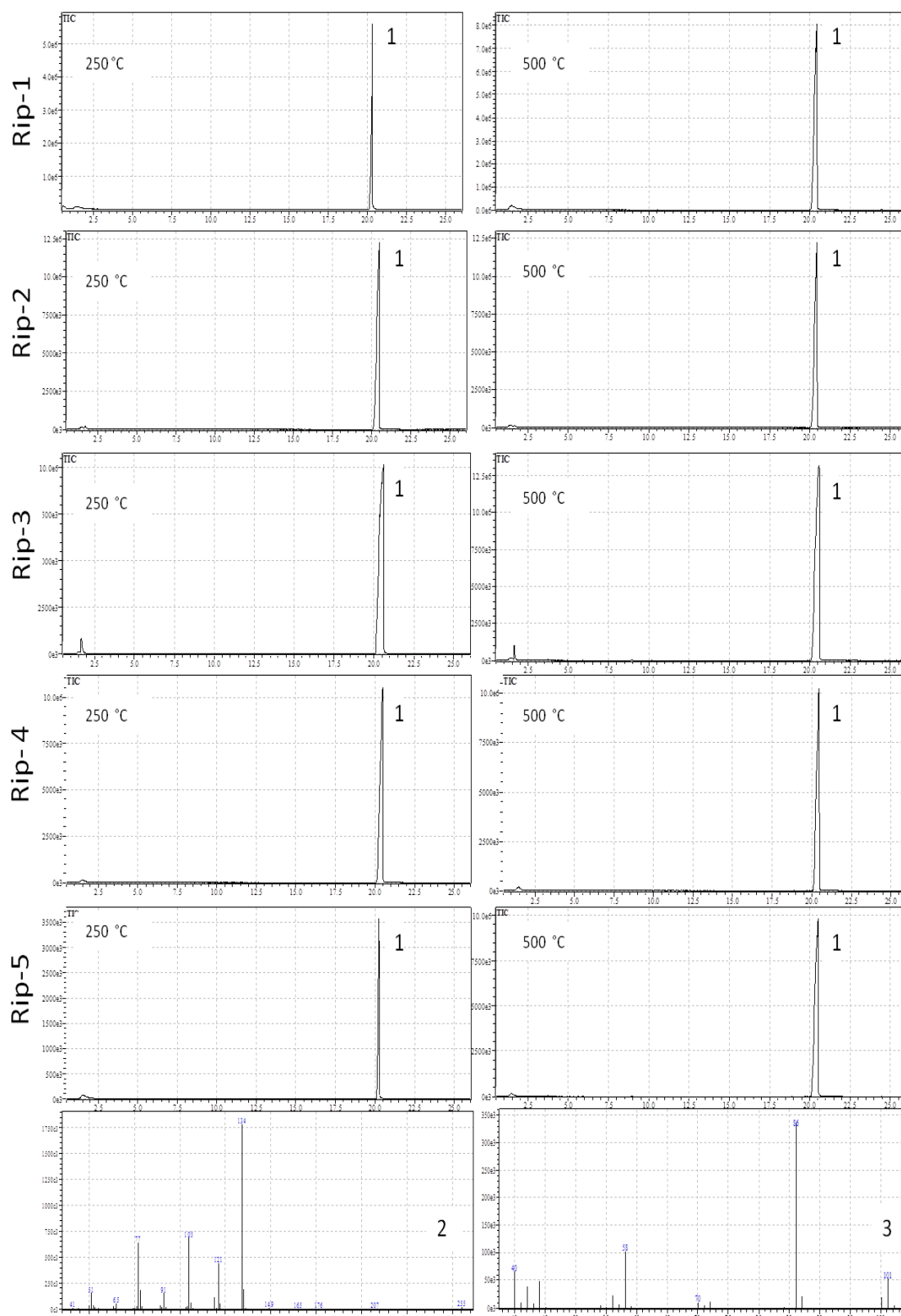


3.6. Pirólise acoplado ao CG/EM

Foi utilizada a pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massas para identificar os produtos de degradação correspondente a etapa de perda de massa observada nas análises termogravimétricas dos lotes RIP1-5. Na Figura 5 estão apresentados os pirogramas obtidos nas temperaturas de 250 e 500 °C. O íon molecular da riparina I apresenta razão massa:carga de (m/z 255,0), sendo este o íon identificado correspondente ao pico no espectro de massa dos lotes, no tempo de 21 min, nas temperaturas de pirólise estudadas. Este fato evidencia que a etapa de perda de massa observadas nas curvas TG corresponde a vaporização da molécula de riparina I na forma íntegra, sem degradação térmica (MOURA et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011).

Os dados corroboram com os resultados visualizados no DSC-fotovisual, onde foi observado a ausência de todo o conteúdo das amostras nas temperaturas em torno de 220 °C. Para o lote RIP-3 é possível observar ainda um pico no início do pirograma identificado como sendo trietilamina, presente na amostra possivelmente como impureza do processo de síntese.

Figura 9. Pirograma dos diferentes lotes de riparina RIP 1-5 obtidos nas temperaturas de 250 e 500 °C, mostrando o pico da riparina I (1), o espectro de massa da riparina (2) e o espectro de massa da trietilamina (3).



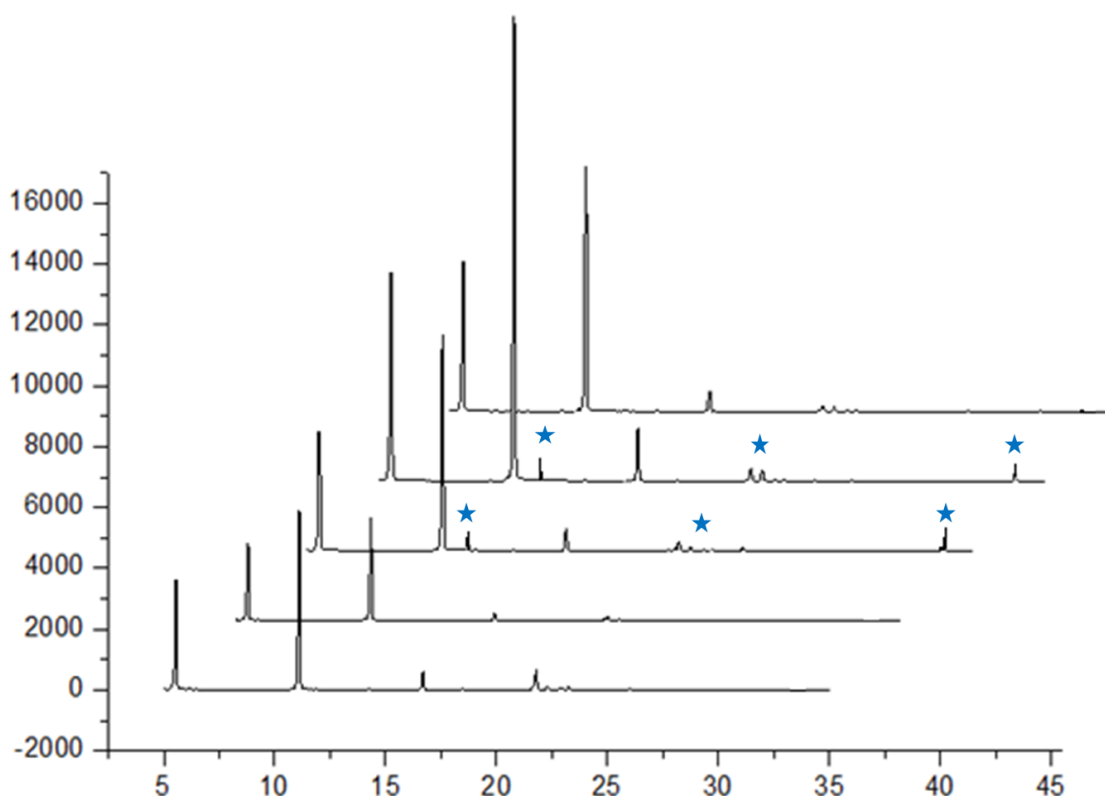
3.7. Difração de raio X (DRX)

A difração de raio X é uma ferramenta analítica extremamente importante na caracterização e determinação de formas polimórficas presentes ou não nas amostras, fornecendo informações sobre o tamanho e estrutura dos cristais (BERNARDI et al, 2013).

Os padrões dos difratogramas para a riparina I dos diferentes lotes RIP1-5 apresentam picos afilados demonstrando lotes com características de cristalinidade e ausência de amorfização (Figura 8). A análise por DRX do pó evidenciou diferenças cristalográficas observadas pela presença ou ausência e intensidade distintas dos picos no eixo 2θ . Os picos na faixa dos ângulos em 12° , na faixa de 21 a 24° e 34° apresentam-se distintos para os lotes RIP-2 e RIP-3. As variações das intensidades dos picos pode ser atribuída as diferenças relacionadas ao tamanho do cristalito (UVAROV; POPOV, 2013). Avaliar o tamanho de cristalito é importante, uma vez que essa propriedade dos materiais pode ser altamente relacionada com as propriedades físico-químicas dos fármacos (LEE et al, 2009).

Estas observações corroboram com os dados obtidos nos dados térmicos e MEV evidenciando as diferenças nas características do hábito cristalino do estado sólido dos diferentes lotes.

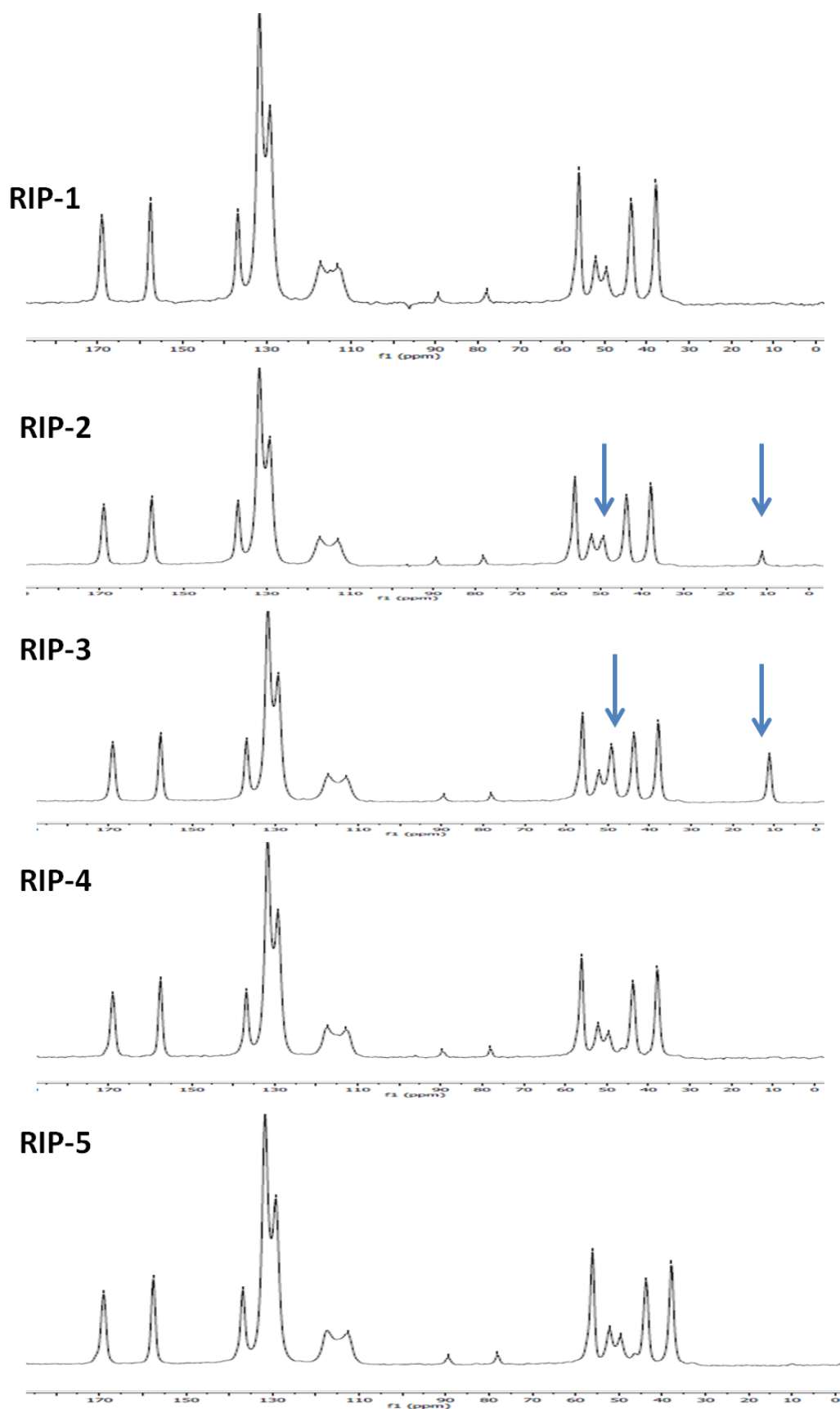
Figura 10. Difratogramas DRX das amostras de riparina I (RIP 1-5).



3.8. Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido

Os deslocamentos químicos dos carbonos no estado sólido podem ser influenciados por vários fatores tais como hábito cristalino, ligação de hidrogênio, efeito iônico e mudanças conformacionais (GONNELLA, 2010). Os espectros de ^{13}C do estado sólido dos lotes da riparina I apresentaram picos em deslocamentos químicos semelhantes em todas as amostras (Figura 11). Observa-se ainda, na Figura 11, para as amostras RIP-2 e RIP-3, a presença de um sinal de carbono com deslocamento químico δ 11,18, característico de metila e os sinais δ 49,59 e δ 52,12 variando com o surgimento deste sinal. Os dados permitem inferir, que estes dois lotes apresenta substância, possivelmente do processo de síntese, presente na rede cristalina do cristal modificando o hábito cristalino.

Figura 11. Espectros de RMN de ^{13}C de sólido para os 5 lotes de riparina I.



4. Conclusão

A determinação do perfil cromatográfico e o RMN de ^1H dos diferentes lotes de riparina I demonstrou a presença de impurezas nas amostras. As técnicas IV, RMN ^1H e ^{13}C de líquidos confirmaram a estrutura química da riparina I nos cinco lotes avaliados. O RMN de ^1H evidenciou que as amostras apresentam impurezas. Nas imagens da MEV observaram-se morfologias diferentes entre os lotes em número de partículas e aglomerados na superfície dos cristais. Além disso, observa-se na imagem para o lote RIP-3, um cristal de forma acicular. Os dados TG demonstraram degradação térmica em uma única etapa, confirmada pela pirólise como sendo da volatilização da riparina I. Os dados DSC, DSC-Fotovisual e DRX evidenciaram estruturas cristalinas distintas para os lotes RIP-2 e RIP3. Os espectros de RMN de sólido mostram picos em deslocamentos químicos característicos da riparina I e deslocamentos diferentes para o lote RIP-2 e RIP3. Os resultados das técnicas analíticas estudadas, permitem inferir na presença de cristais com hábitos cristalinos diferentes, possivelmente pela presença de impurezas durante a cristalização das amostras. Os resultados evidenciam a necessidade de um maior controle da síntese dessa substância a fim de assegurar a sua reprodutibilidade garantindo a integridade da forma física da riparina I, lote a lote.

5. Referências

RAW, A. S. FAURNESS, M. S. GILL, D. S., ADAMS, R. C., HOLCOMBE, F. O., YU, L. X., **Advanced Drug Delivery Reviews** 56, 397–414, 2004.

BERNARDI, L. S., FERREIRA F.F., CUFFINI, S. L., CAMPOS, C. E. M., MONTI, G. A., KUMINEK, G., OLIVEIRA, P. R. CARDOSO, S. G. Solid-state evaluation and polymorphic quantification of venlafaxine hydrochloride raw material using the Rietveld method. **Talanta** 117, p. 189–195, 2013.

CARINI, J.P., PAVEI, C., SILVA, A.P.C., MACHADO, G. MEXIAS, A.S. PEREIRA, V.P, FIALHO, S.L. MAYORGA, P. Solid state evaluation of some

thalidomide raw materials international **Journal of Pharmaceutics** 372, p. 17–23, 2009.

SYKULA-ZAJA, A.; LODUGA-CHRUSCINSKA, E.; PALECZ, B.; DINNEBIER, R. E.; GRIESSER, U. J.; NIEDERWANGER, V. Thermal and X-ray analysis of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 105, p. 1031–1036, 2011.

LIN, S. Y. Molecular perspectives on solid-state phase transformation and chemical reactivity of drugs: metoclopramide as an example. **Drug Discovery Today** 20, p. 209-222, 2015.

LLINA` S, A. & GOODMAN, J. M. Polymorph control: past, present and Future **Drug Discovery Today**, 13, p. 198-210, 2008.

SANTOS, L. GARCÍA, C. CHECURA, DONADÍO, C. L. G., FERNANDE, C., ORGUEIRA, H., COMIN, M. J. Synthesis and characterization of new related substances of the antiarrhythmic drug dronedarone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 114, p. 441–446, 2015.

BORGHETTI, G.S., CARINI, J.P., HONORATO, S.B., AYALA, A.P., MOREIRA, J. C. F. BASSANI, V.L., Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in the solid state. **Thermochimica Acta** 539 p. 109– 114, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, 4^a ed, Cengage Learning: São Paulo, 2010.

GUO, Y., SHALAEV, E., SMITH, S. Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. **Trends in Analytical chemistry** 49, p. 137–144, 2013.

LÁNGA, P., VÁRKONYI, E., ULRICH, J., SZABÓ-RÉVÉSZ, P., AIGNER, Z. Analysis of the polymorph changes of a drug candidate, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 102, p.229–235, 2015.

GYSEGHEM, E. V., STOKBROEKX, S., AEMAS, H. N., DICKENS, J., VANSTOCKEM, M., BAERT, L., ROSIER, J., SCHUELLER, L., MOOTER, G. V. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: Interconversion of amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 38, p. 489–497, 2009.

PINTO, M. F., MOURA, E. A., SOUZA, F. S., MACEDO, R. O. Thermal compatibility studies of nitroimidazoles and excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** 102, p. 323-329, 2010.

MOURA, E. A., CORREIA, L. P. PINTO, M. F., PROCÓPIO, J. V. V., SOUZA, F. S. MACEDO, R. O. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry** 100:289–293, 2010.

OLIVEIRA, A. H., MOURA, E. A., PINTO, M. F., PROCOPIO, J. V. V., SOUZA, V. G., SOUZA, F. S. MACEDO, R. O. Thermal characterization of raw material pentoxifylline using thermoanalytical techniques and Pyr-GC/MS. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry** 106:763–766, 2011.

BÖER, T. M. PROCOPIO, J. V. V., NASCIMENTO, T. G., MACEDo, R. O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 73 ,18– 23, 2013.

AGRAWAL, S., ASHOKRAJ, Y., BHARATAM, P. V., PILLAI, O., PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 22, 127–144, 2004.

ARAUJO, G. B. L., JUNIOR, P.; GUTIERREZ, S. A.; SANTOS, C. O. P.; MATOS, J. R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas**. 33(1):27-36, 2012.

GONNELLA, N.C., SMOLIGA, J. A., Campbell, S., BUSACCA, C. A., CERRETA, M., VARSOLONA, R., NORWOOD, D. L., Study and characterization of crystalline hydrate/polymorph forms of 5,11-dihydro-11-ethyl-5-methyl-8-(2-(1-oxido-4-quinolinyl)ethyl-6Hdipyrido(3,2-B:2,3-E)(1,4)diazepin-6-one by solid-state NMR and solution NMR **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 51,1047–1053, 2010.

Capítulo III

**Desenvolvimento e Validação de Método Bionalítico
para a quantificação de Riparina I em plasma de ratos**

Wistar por CLAE-EM

Desenvolvimento e Validação de Método Bionalítico para a quantificação de Riparina I em plasma de ratos Wistar por CLAE-EM

1. Introdução

A farmacocinética pré-clínica tem papel fundamental no processo de desenvolvimento e seleção de novos fármacos. Nesta etapa uma abordagem mais focada na farmacocinética tem sido adotada uma vez que uma grande parte dos compostos falha em fases iniciais do desenvolvimento devido as propriedades farmacocinéticas inadequadas (ADAMS & BRANTNER, 2010).

O primeiro passo, a ser considerado na determinação dos parâmetros que caracterizam a absorção e disposição do fármaco no organismo é o desenvolvimento de um método bioanalítico que dê suporte aos estudos farmacocinéticos que serão conduzidos. Estes métodos são necessários para a quantificação destes fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas como plasma, urina e tecidos (STORPIRTIS et al, 2011).

A cromatografia líquida de alta-eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EMn) é reconhecida como uma poderosa ferramenta para a determinação quantitativa de compostos ativos em amostras biológicas devido à seletividade e sensibilidade atribuídas a técnica (TOYO'OKA, 2013; WANG et al, 2013). A importância desta técnica tem sido demonstrada pela utilização em um grande número de pesquisas em fluidos biológicos na área farmacêutica (AGNESOD et al, 2013; XIONG et al, 2013).

O desenvolvimento de um método cromatográfico bioanalítico envolve a otimização de várias etapas, desde a preparação da amostra até o estabelecimento das condições instrumentais. O método de quantificação deve apresentar separação cromatográfica livre de interferentes, sendo específico para o analito e seu padrão interno. A existência de proteínas presentes em matrizes biológicas (soro, plasma, sangue, urina) torna necessário a otimização de técnicas de extração adequadas que possibilitem a análise dos componentes de interesse (LANÇAS, 2012).

O propósito de um método de preparo de amostra eficiente é extrair, concentrar e transferir o analito de interesse a partir de uma matriz complexa para um meio que possa introduzi-lo no sistema analítico, com adequada recuperação, livre de interferentes e perda mínima da amostra, utilizando procedimentos simples, reprodutíveis, rápidos e de baixo custo (MULLER et al, 2002). A escolha e otimização de um método de preparo adequado é o fator chave para obtenção de resultados exatos e confiáveis, não é uma tarefa fácil, portanto a seleção da técnica e as condições experimentais devem ser conduzidas rigorosamente (JARDIM, 2010).

Vários métodos de extração devem ser avaliados na etapa de preparo das amostras. Apesar dos grandes avanços tecnológicos na área de clean-up com o desenvolvimento e utilização de microextração em fase sólida, procedimentos de extração on line, a extração por precipitação de proteínas e extração líquido-líquido, são técnicas clássicas ainda amplamente utilizadas na separação de fármacos a partir de matrizes biológicas (SU et al, 2015; HE et al, 2015; QUIAN et al, 2015; MA et al, 2015; WANG et al, 2015) . No entanto apresentam vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas de acordo com as características intrínsecas de cada molécula, da matriz biológica e necessidades do método analítico.

O efeito dos constituintes da matriz é um problema comumente observado na quantificação de fármacos a partir de métodos bioanalíticos cromatográficos, favorecendo distorção de espectros, supressão iônica e aumento do sinal analítico, afetando o desempenho desta técnica. SANTOS et al (2011), avaliou o efeito matriz da Riparina I e Riparina III em amostras de sangue de ratos Wistar por HPLC-DAD, avaliando a influência do solvente, força e tempo de centrifugação no efeito matriz e na recuperação destas riparinas.

Métodos bioanalíticos usados para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade devem garantir a confiabilidade dos resultados obtidos a partir de uma matriz específica para o qual foi desenvolvido. A validação de métodos bioanalíticos é o processo utilizado para garantir que os parâmetros analíticos estão adequados para o uso pretendido, garantindo a confiabilidade dos resultados (GONÇALVES, BONATO & ZAINAGHI, 2009). A validação é

uma ferramenta de controle de qualidade imperativa aos métodos analíticos desenvolvidos ou otimizados.

A quantificação em matrizes biológicas é passível de um grande número de variáveis, de forma que o processo de validação de métodos cromatográficos aplicados em bioanálise é extremamente laborioso. Na fase de validação devem ser ponderadas variáveis do método como preparo da amostra, procedimentos de amostragem, separação cromatográfica, detecção e análise dos dados. A validação de método bioanalíticos deve abranger a validação do método analítico e a avaliação da estabilidade dos analitos na matriz biológica, antes da utilização do método para a análise rotineira (STORPIRTS, 2011).

Para métodos que visam à determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, devem ser avaliados os parâmetros de seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, recuperação e estabilidade do fármaco em solução e na matriz biológica. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro de um período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada (BRASIL, 2012).

A quantificação da Riparina I em plasma utilizando CLAE-EM vislumbrando a caracterização das propriedades farmacocinéticas pré-clínica deste candidato a fármaco, ainda não foi descrito. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método bioanalítico eficiente, sensível e seletivo por meio da otimização da técnica de extração e separação analítica para a determinação de riparina I em plasma de rato Wistar.

2. Material e Método

2.1. Materiais

Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico e de extração foram utilizadas as matérias-primas riparina I (analito) e a substância avaliada como padrão interno riparina B (PI), gentilmente sintetizadas e cedidas pelo prof. Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez, da UFPI.

Os reagentes utilizados foram os solventes acetonitrila (MeCN) e diclorometano grau HPLC, obtidos no comércio local (Tédia[®] Brasil), os solventes, grau analítico, acetato de etila e clorofórmio (Vetec[®], Brasil), ácido clorídrico (Dinâmica[®]) e ácido fórmico (Vetec[®], Brasil). A água ultra-pura foi obtida utilizando um sistema purificador Milli-Q[®] da Milipore (Billerica, MA, EUA).

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no estudo foram cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE) da Shimadzu (Prominence) acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-EM), equipado com um sistema de bombeamento de solvente LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A₅, analisador de massas Íon da Bruker (Amazon X), com fonte de nebulização por eletronspray. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna[®] C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Luna[®] C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm) adquirido da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR). Foram utilizados balança analítica da Shimadzu com precisão de 0,001mg, centrífuga (Jouan MR 23 I), vórtex JK MS1, freezer -20 °C da Consul e banho ultrasom Brasonic 220.

2.3. Desenvolvimento e Validação do método bioanalítico por CLAE-EM

2.3.1. Detecção por espectrometria de massas

Para o desenvolvimento do método bioanalítico por CLAE-EM o primeiro passo consistiu na otimização dos parâmetros de ionização da riparina I e riparina B, de forma a se obter íons precursores e fragmentos de alta intensidade no espectrômetro de massa.

A riparina I foi infundida primeiramente no espectrômetro em soluções H₂O:MeCN (50:50) na concentração de 100 ng/mL. A água foi aditivada com 0,1 % de ácido fórmico ou hidróxido de amônia e foram avaliadas a ionização e

detecção por eletrospray no modo ESI (+) e ESI (-) para cada aditivo, separadamente.

Os parâmetros avaliados para obtenção do íon precursor de maior intensidade foram: a voltagem do capilar (3000, 3750 e 4500), temperatura da fonte de ionização (220, 260 e 300 °C), fluxo do gás de dessolvatação (6, 8 e 10 L/min) e pressão do nebulizado (7, 11 e 15 psi).

Para avaliar a influência destes parâmetros, a fim de se obter o “space design” da melhor ionização do analito, de acordo com o Quality by Design, foi utilizado o Planejamento Fatorial $2^4 + 2$ pontos centrais, utilizando como variáveis de entrada os parâmetros nos níveis descritos acima. A variável de resposta em estudo foi à intensidade do íon precursor da riparina I.

Para a ionização e detecção do PI foi utilizado os parâmetros otimizados para a riparina I, avaliou-se ainda os parâmetros de voltagem do capilar e a amplitude de quebra observando-se à melhor ionização.

2.3.2. Condições cromatográficas

Para determinar as condições adequadas para quantificação da riparina I com separação adequada do PI e livre de interferentes da matriz, foram avaliadas diferentes proporções de eluição dos solventes H₂O aditivada e MeCN. O solvente MeCN foi utilizado de acordo com estudos com a riparina I, em CLAE-DAD, de Santos (2011).

2.3.3. Método de Extração no Plasma

Para determinar o método mais adequado de extração da riparina I e riparina B do plasma, foram avaliados os métodos de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido.

Soluções padrão de riparina I e padrão interno na concentração de 1mg/ml em MeCN foram preparadas e diluídas até concentração finais de 20 µg/mL do analito e 1 µg/mL do PI.

Amostras de 900 µL plasma de ratos wistar machos foram contaminadas com 50 µL da solução do analito e 50 µL da solução do padrão interno,

submetidas a 30 s de agitação no vórtex, de forma a se obter concentração plasmática finais de 1000 ng/mL da riparina I e 500 ng/mL da riparina B.

Em ependorf de 1,5 mL foram adicionados 100 µL de plasma contaminado e submetido às extrações. Para cada método de extração foram avaliadas amostras de plasma branco (sem o analito e PI), amostra de plasma adicionada apenas da solução do padrão interno e amostras de plasma apenas com solução do analito, ambos nas mesmas concentrações analíticas do plasma contaminado.

O efeito matriz foi calculado utilizando a equação abaixo:

$$\text{Efeito de matriz \%} = \left(\frac{\text{Resposta Analitos adicionados após extração}}{\text{Resposta Solução de padrões em solvente}} - 1 \right) \times 100$$

2.3.3.1. Precipitação de proteínas

Para o método de precipitação de proteínas foi utilizado como solvente precipitador a MeCN. Em ependorf de 1,5 mL contendo 100 µL de plasma foi adicionado 600 µL MeCN e agitadas por 1 min em vórtex. As amostras foram então centrifugadas por 10 min na rotação de 10000 g (n=6). Em seguida o sobrenadante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio durante 10 minutos. O resíduo obtido foi reconstituído em fase móvel, com agitação em sonicador por 5 minutos. Filtrou-se através de filtro de membrana PVDF 0,45 µm e uma alíquota de 20 µl foi injetada no cromatógrafo.

Em seguida o mesmo método de extração foi avaliado variando-se a quantidade de ACN (400 µl e 500 µl), aumento da força de rotação (12000 e 16000) e adição de ácido fórmico 0,1% (50 µl e 80 µl)

2.3.3.2. Extração líquido-líquido

Para avaliação do procedimento de extração líquido-líquido os solventes utilizados foram: diclorometano, clorofórmio, éter etílico e acetato de etila. Em eppendorfs de 1,5 mL foram adicionados a 100 µl de plasma, em seguida

adicionou-se 1 mL do solvente extrator testado e agitou-se por 1 minuto. Os eppendorfs foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos, para separação das fases. O sobrenadante foi transferido para vial e seco sob fluxo de nitrogênio durante 10 minutos. O resíduo obtido foi reconstituído em fase móvel, com agitação em sonificador por 5 minutos. Filtrou-se através de filtro de membrana PVDF 0,45 µm e uma alíquota de 20 µl foi injetada no cromatógrafo.

Neste método também foi avaliado a eficiência da extração dos solventes após acidificação do plasma com 50 µl de ácido clorídrico 0,1M (DAI et al, 2014).

2.4. Validação do Método Bioanalítico

2.4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando em torno 200 g. Todos os animais foram alojados em gaiola padrão, submetidos a ciclos de 12 horas de claro/escuro, sendo alimentados diariamente com ração padrão com acesso livre a água potável.

2.4.2. Protocolo e procedimento in vivo

Os experimentos foram realizados apenas após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal da Paraíba – UFPB (Certificado N° 0308/13).

Após o sacrifício do animal as amostras de sangue foram coletadas através do plexo braquial e transferidas para tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O plasma foi separado por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e armazenados a temperatura de -20 °C quando necessário e descongelado apenas no momento da análise.

2.4.3. Ensaios de Validação

O método bioanalítico desenvolvido foi validado seguindo os procedimentos preconizados pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA.

2.4.3.1. Seletividade

A seletividade do método foi confirmada pela análise de amostras de plasma obtidas de fontes distintas, sendo 4 amostras de plasma normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Os cromatogramas obtidos foram comparados com os cromatogramas do analito na concentração do limite inferior de quantificação e o padrão interno na concentração de trabalho.

As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

2.4.3.2. Recuperação

A recuperação é a medida da eficiência da extração de um método analítico. É expressa pela relação entre os resultados analíticos obtidos de amostras da matriz contaminada com concentração conhecida do analito, após ser submetida ao processo de extração, com os resultados analíticos da solução padrão, na mesma concentração, não submetidas ao processo de extração.

A recuperação do método foi avaliada pela análise de amostras de plasma contendo riparina I em três diferentes concentrações CQB (10 ng/ml), CQM (75 ng/ml) e CQA (600 ng/ml). A recuperação do padrão interno riparina B também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (50 ng/ml). As análises foram realizadas em sextuplicata.

2.4.3.3. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado em três níveis de concentração controle de qualidade; CQB, CQM e CQA. Para cada nível de concentração foi calculado o

fator de matriz normalizado (FMN), pela relação dos resultados analíticos obtidos com a contaminação do analito ao plasma após o processo de extração e em solução, preparada nos mesmos níveis de concentração. O efeito da matriz não é significativo quando o coeficiente de variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}}$$

2.4.3.4. Efeito residual

O efeito residual foi determinado pela análise de três injeções alternadas de amostras de plasma branco, sendo uma antes e duas após a injeção do nível de concentração mais alto da curva LSQ. A resposta de possíveis picos interferentes no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do PI deve ser inferior a 5 % da resposta do PI.

2.4.3.5. Linearidade

A linearidade e o intervalo foram determinados a partir da construção da curva de calibração obtida durante três dias consecutivos, em 10 níveis de concentrações diferentes (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 200,0; 250,0; 600,0 e 750 ng/mL). As curvas analíticas de dez pontos foram plotadas para resposta (área do fármaco/área do padrão interno) versus a concentração do analito. Foram preparadas soluções estoque da riparina I que foram diluídas para soluções de trabalho em MeCN e em seguida foram adicionadas ao plasma branco e em seguida submetidas ao processo de extração. Amostras controle de qualidade nos níveis; baixa (CQB), média (CQM), alta (CQA) e de diluição

(CQD) foram determinados na construção da curva de calibração e são descritos abaixo:

- CQB – concentração do analito em até 3 vezes o valor do limite inferior de quantificação (LIQ);
- CQM - concentração do analito em concentração próxima a média entre os limites inferior e superior de quantificação;
- CQD - concentração acima da maior concentração da curva, analisado por meio de diluição para concentração conhecida da curva de calibração;
- CQA - concentração 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração.

Desta forma, de acordo com a RDC 27, na curva de calibração analítica as amostras de controle de qualidade foram: CQB (10 ng/mL), CQM (75 ng/mL), CQA (600 ng/mL) e a concentração CQD, que foi obtida a partir da contaminação do plasma com 1000 ng do analito e diluição deste com plasma branco na concentração final de 100 ng do analito em 100 µL do plasma. Foram avaliadas amostras branco (plasma contaminado de padrão do analito e padrão interno) e amostras zero (plasma contaminado apenas com o padrão interno), durante a obtenção da curva de calibração.

2.4.3.6. Precisão e Exatidão

Durante a avaliação da precisão de um método investiga-se a proximidade de medidas individuais do analito quando o procedimento é realizado repetidamente. A exatidão avalia a proximidade da média de valores nominais fornecido pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do analito.

A precisão é expressa como desvio padrão relativo (DPR) não admitindo-se valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), obtido pela equação abaixo;

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

Onde não se admitem valores superiores a $\pm 15\%$ do valor nominal exceto na concentração do LIQ onde se admitem valores $\pm 20\%$.

A precisão foi verificada por repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de cinco concentrações diferentes (5,0; 10,0; 75,0; 100,0 e 600,0 ng mL⁻¹) em sextuplicatas no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição das concentrações em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada pela análise da variação das amostras em sextuplicatas intra e inter-dias em três dias diferentes nas mesmas concentrações utilizadas na precisão.

2.4.3.7. Avaliação da Estabilidade

2.4.3.7.1. Estabilidade do analito em matriz biológica

2.4.3.7.1.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

A estabilidade do analito na matriz biológica após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, foi determinada em amostras de plasma branco, contaminadas com solução padrão de forma a se obter os níveis de concentração CQB, CQM e CQA, em sextuplicata para cada nível.

As amostras foram congeladas por 24 h (-20 °C) e após este tempo descongeladas a temperatura ambiente. Após descongeladas (1 hora) as amostras foram novamente congeladas na mesma temperatura por mais um período de 24 h, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Após os ciclos as amostras foram contaminadas com o PI na concentração de trabalho (50 ng/mL), e em seguida submetidas ao processo de extração.

Os resultados analíticos das amostras foram comparados com os resultados obtidos das amostras recém-preparadas, nos três níveis de concentração estudados. Os resultados obtidos entre as médias do valor das concentrações experimentais obtidas e o valor nominal não deve ser superior à 15%.

2.4.3.7.1.2. Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração do analito foi conduzida através da análise de amostras de plasma contaminadas nos três níveis de concentração CQB, CQM e CQA (n= 6), processadas após permanecerem a temperatura ambiente por um período de 5 horas. Após este tempo as amostras foram contaminadas com PI na concentração de trabalho (50 ng/mL), submetidas ao processo de extração e os resultados analíticos nos três níveis de concentração foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas. Os resultados entre as médias do valor das concentrações experimentais obtidas e o valor nominal não deve ser superior a 15%.

2.4.3.7.1.3. Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi avaliada através da análise de amostras processadas de plasma contaminadas com analito, nos três níveis de concentração CQB, CQM e CQA e do PI, após permanecerem a temperatura ambiente por um período de 8 horas. Os resultados analíticos nos três níveis de concentração foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas. Os resultados entre as médias do valor das concentrações experimentais obtidas e o valor nominal não deve ser superior a 15%.

2.4.3.7.1.4. Estabilidade longa duração

Na estabilidade de longa duração amostras de plasma branco contaminadas com solução do analito nos níveis de concentração CQB, CQM e CQA foram congeladas a – 20 °C por um período de 30 dias. Após este período, as amostras foram descongeladas e contaminadas com o padrão interno, submetidas ao processo de extração e analisadas em triplicata. Os resultados entre as médias do valor das concentrações experimentais obtidas e o valor nominal de amostras recém-preparadas não deve ser superior a 15%.

2.4.3.7.2. Estabilidade do analito e PI em solução

As soluções do analito e padrão interno foram avaliadas com relação a estabilidade das soluções de trabalho e estoque em temperatura de refrigeração – 4 ° C por 15 horas. Após este período as soluções foram utilizadas para contaminação do plasma nas concentrações CQ e concentração padrão para o PI e analisadas em triplicata. Os resultados entre as médias do valor das concentrações experimentais obtidas e o valor nominal não devem apresentar desvio superior a 10%.

2.5. Análise estatística

A comparação dos grupos de dados, na análise do analito e padrão interno foi, feita através de ANOVA. Os dados da validação foram avaliados quanto a normalidade e a comparação entre grupos feita através de ANOVA. Os dados da linearidade foram avaliados através da análise de resíduos e ANOVA para verificar o ajuste do modelo.

3. Resultados e Discussão

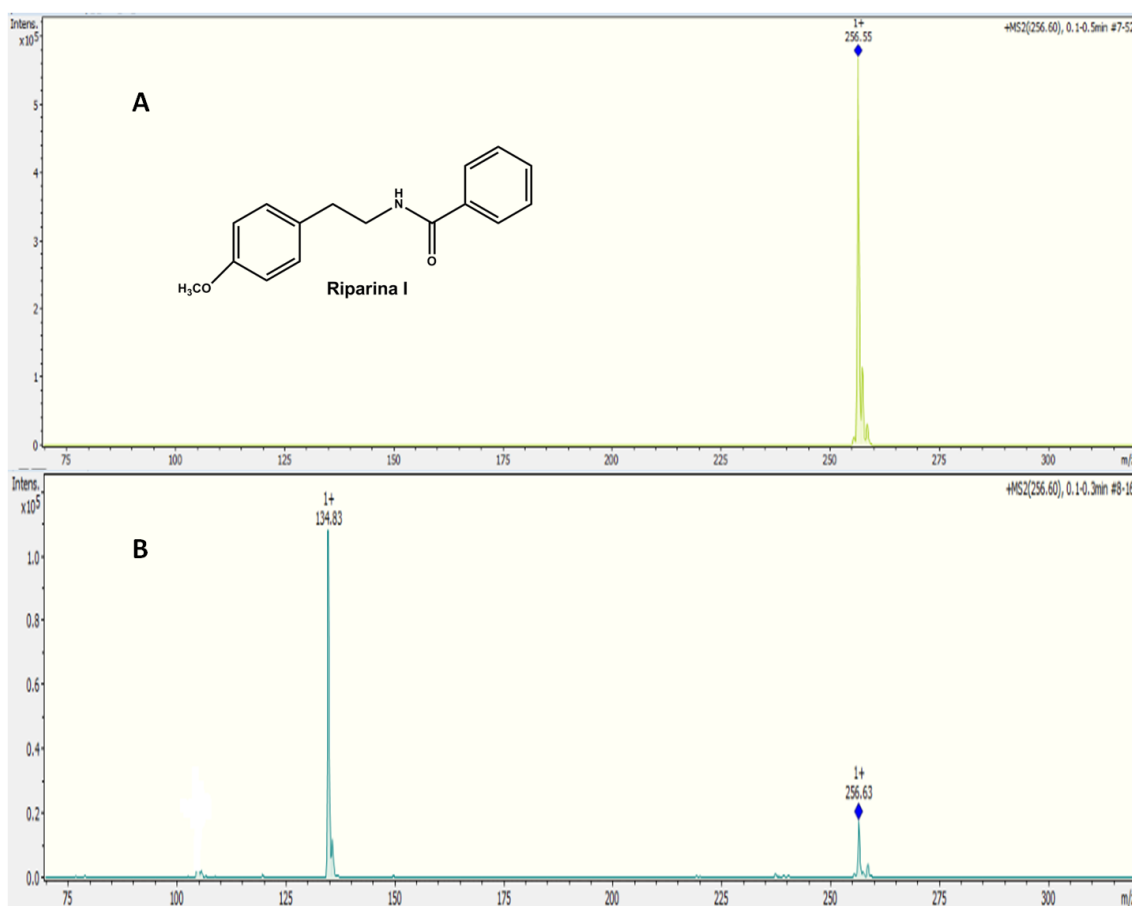
3.4. Desenvolvimento do método analítico

Para a ionização da ripaina I as intensidades do íon precursor foram maiores no modo ESI (+) para os dois aditivos avaliados, no entanto o aditivo com NH_4OH forneceu intensidade maiores. No modo ESI (-) com aditivo CHOOH o íon precursor não apresentou intensidades de sinal eficientes para a sua detecção apresentando íon em níveis de ruído.

Os parâmetros do espectro de massas foram então avaliados no modo ESI (+), com aditivo NH_4OH , onde o íon precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$, com relação massa/carga (m/z) é 256,55, que corresponde a massa molar da Riparina I (255,12 g/mol) somada a massa do hidrogênio. Em seguida, foi aplicada energias de colisão crescente até 30 eV e observado no espectro de fragmentação o fragmento mais estável e de maior intensidade, que

correspondeu ao m/z 134,83. Assim, adotou-se a transição de m/z 256,55 para m/z 134,83, para a detecção de riparina I (Figura 1).

Figura 1. Espectros ESI(+) – EM de riparina I, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 256,55 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 134,83.

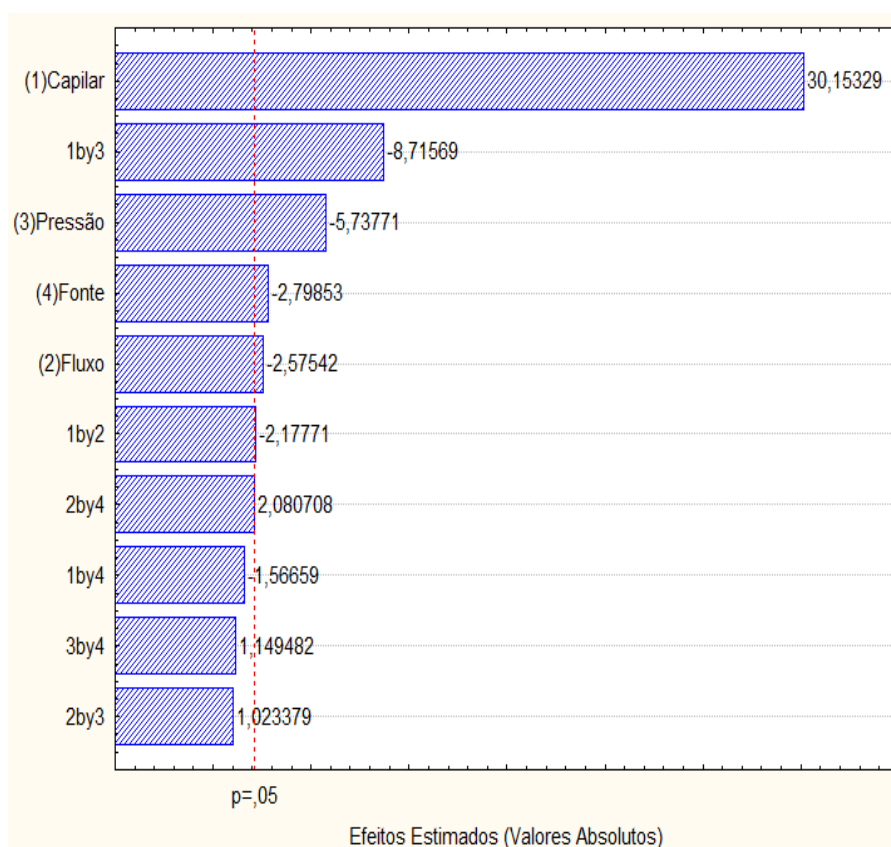


A utilização do planejamento experimental fatorial no estudo de ionização permitiu avaliar simultaneamente os efeitos dos parâmetros no aumento significativo da intensidade do íon precursor m/z 134,83, e estabelecer o espaço (QbD) onde estas variáveis podem ser aplicadas para o padrão interno sem comprometimento da ionização do analito.

O diagrama de Pareto (Figura 2) apresenta com nível de significância de 95,00 % que todos os parâmetros estudados influenciaram na variável de resposta, onde a voltagem do capilar foi a que mais influenciou, sendo os

melhores resultados observados com o aumento da voltagem do capilar nos níveis estudados.

Figura 2. Influência dos parâmetros na variável de resposta para a ionização da Riparina I no espectrômetro de massa.

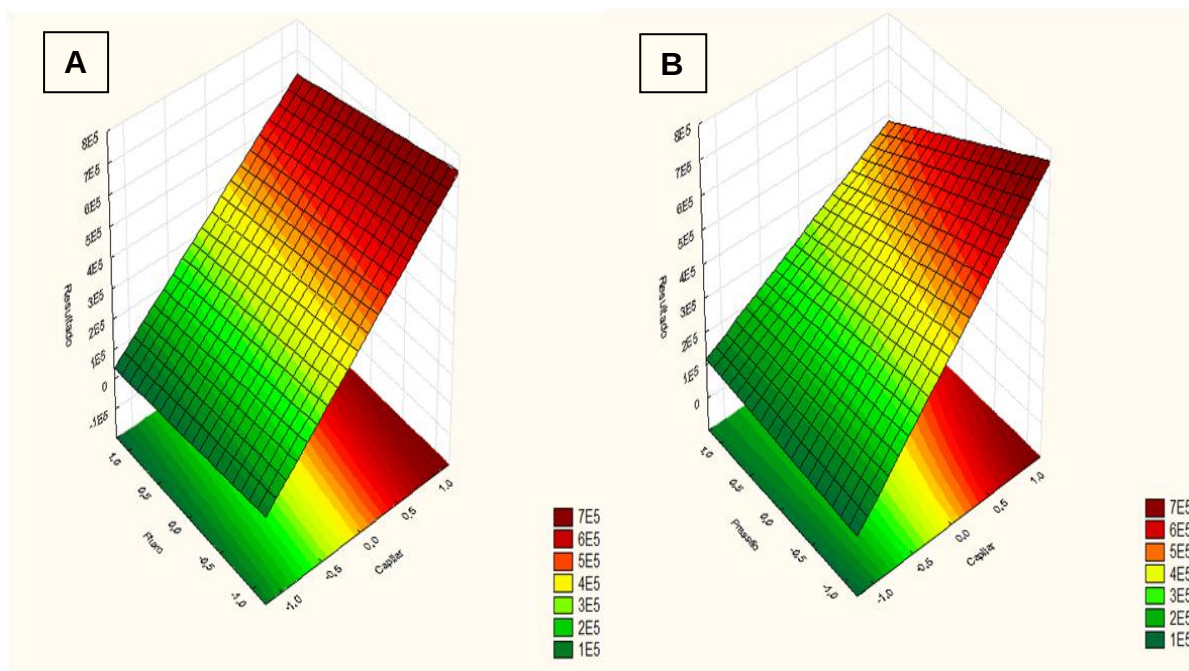


Através dos dados experimentais obtidos, após a análise de variância foi possível ajustar o modelo e obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 3). A Figura 3 – A, representa a superfície de resposta tridimensional gerada a partir da combinação das variáveis capilar e pressão. Nesta Figura observa-se que as combinações das variáveis nos níveis máximo (capilar) e mínimo (pressão) influenciam fortemente em função da intensidade de resposta, ou seja, o deslocamento nas direções de mínima (pressão) e máxima (capilar) provoca um incremento adicional na intensidade do íon 135,01. Fato semelhante acontece na Figura 3 - B, onde é possível observar que melhores

valores de intensidade são observados na região com o aumento do nível do capilar e o decréscimo do fluxo.

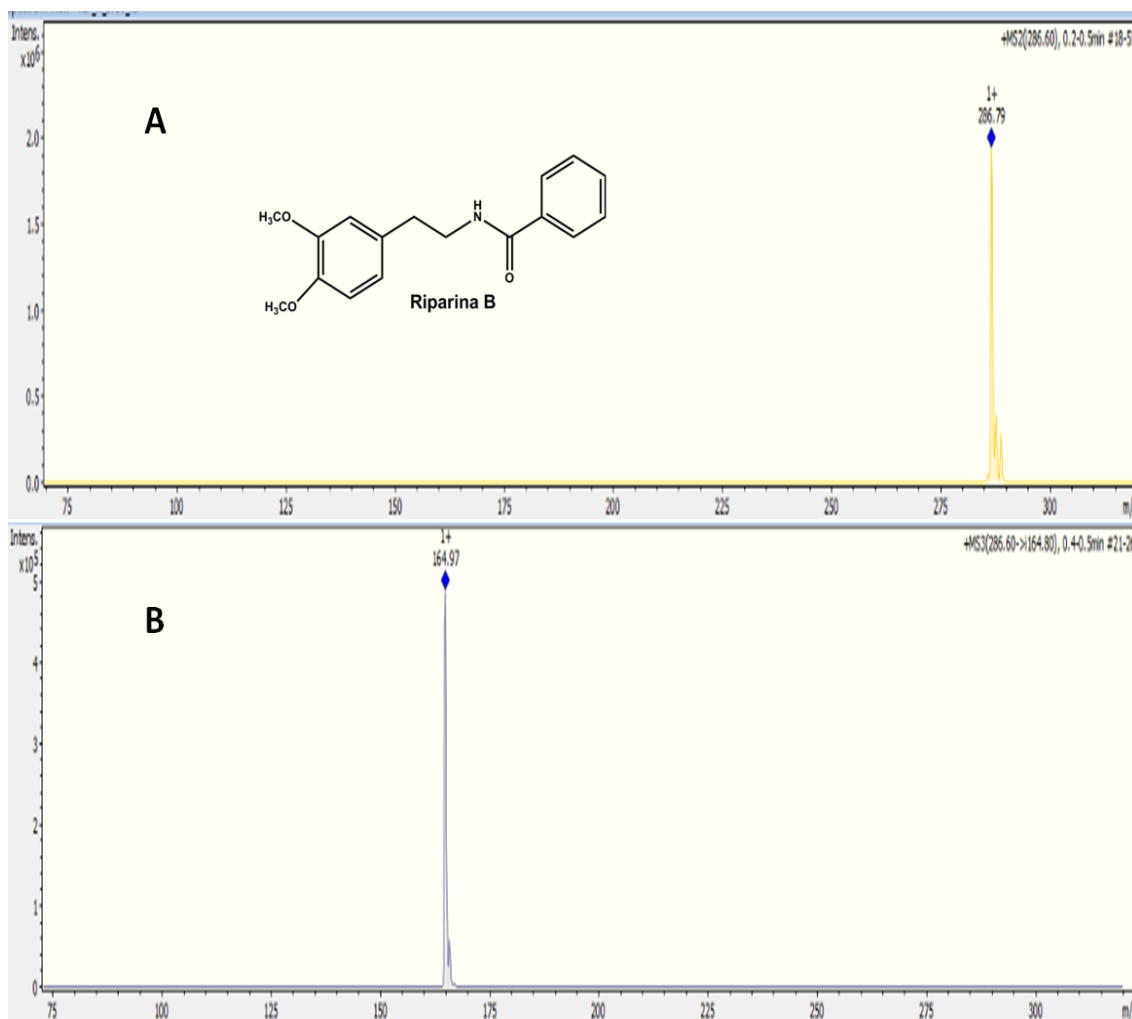
As condições do espectrômetro de massas definidas a partir do tratamento estatístico do QdB foram: voltagem do capilar 4500, fluxo do gás de dessolvatação 8, pressão do gás 7 e temperatura da fonte de 220 °C.

Figura 3. Gráfico da superfície de resposta da influência do fluxo e pressão na ionização da riparina I.



Para a ionização do padrão interno, foram então feitas infusões diretas de solução de 100 ng/mL (H_2O : MeCN), no modo ESI (+) com NH_4OH 0,1 %, da riparina B. As condições previamente otimizadas para a riparina I foram adequadas para a ionização e detecção da riparina B. O íon precursor selecionado foi o íon precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ correspondente a relação (m/z) de 286,79 que corresponde a massa molar da Riparina A (285,36 g/mol) somada a massa do hidrogênio (Figura 5). Empregando-se a amplitude de quebra de 0,6 o fragmento de maior intensidade foi o (m/z) de 164,97. Assim, adotou-se a transição de m/z 286,79 para m/z 164,97 para detecção da riparina B no espectrômetro de massa (Figura 4).

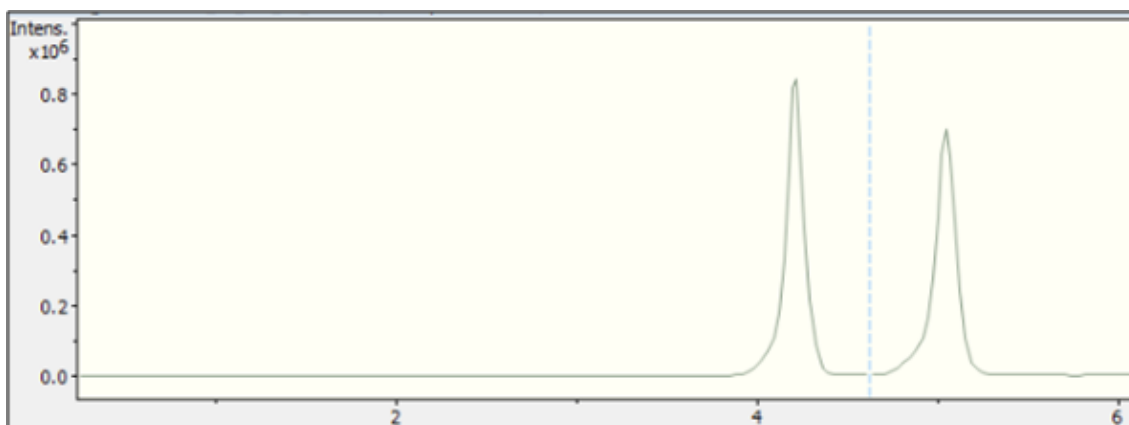
Figura 4. Espectros ESI(+) – EM de riparina B, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 286,79 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 164,97.



As condições cromatográficas devem ser estabelecidas para que se tenha uma eficiência de separação do analito e padrão interno, entre si, e dos possíveis interferentes da matriz (JIANSEN et al, 2015). Na determinação das condições cromatográficas foi utilizado inicialmente na fase móvel solução aquosa 0,1% de NH₄OH e MeCN (50:50), com eluição isocrática que é mais simples e conveniente de usar (MA TAO et al, 2015). Esta condição foi eficiente para eluição cromatográfica dos picos das riparinas com intensidade e simetria

adequados e tempos de retenção de 7 min para a riparina B e 8 min para a riparina I, com tempo final de 12 min. A proporção de MeCN foi então aumentada para diminuir os tempos de retenção. A proporção final foi de 65% de MeCN, com tempo de corrida de 6 min, o tempo de retenção da riparina B foi de 4,2 min e de 5,1 min para a riparina I (Figura 5).

Figura 5. Cromatograma CLAE-EM representativo da condição cromatográfica pré-definida para eluição da riparina I e riparina B em solução (H₂O:MeCN) aditivada com 0,1% de NH₄OH.



3.2. Métodos de Extração

Após a determinação da condição cromatográfica capaz de determinar o analito e padrão interno em solução, vários procedimentos de extração foram avaliados.

A eficiência do pré-tratamento de matrizes biológicas com a finalidade de se remover proteínas e obter amostras livres de possíveis interferentes é fundamental para análises em CLAE-EM (ZHAO et al, 2015). Minimizar o efeito matriz e obter extrações do analito com valores eficientes de recuperação deve ser propósito da escolha do método de extração (SHI et al, 2015). Neste estudos os métodos de extração líquido-líquido e precipitação de proteínas foram comparados quanto a eficiência de extração das riparina I e B.

No método de extração líquido-líquido os maiores valores de recuperação e menores ruídos na linha de base foram obtidos com a extração após a acidificação do plasma. Os solventes utilizados no método de extração líquido-

líquido apresentaram recuperações relativamente baixas (Tabela I). O solvente extrator que apresentou melhor recuperação foi o diclorometano, com média de recuperação e coeficiente de variação de $65,24\% \pm 7,79$. A recuperação do analito no método desejáveis devem ser próximos a 100%, embora valores inferiores podem ser aceitos desde que seja comprovada a reprodutibilidade do processo (BRASIL, 2003).

Tabela 1. Recuperação para as Riparina A (PI) e Riparina I no método de extração Líquido-Líquido para os diferentes solventes.

Solvente Extrator	% Recuperação Absoluta ¹	
	PI	Rip. I
Diclorometano	$54,08 \pm 10,98$	$65,24 \pm 7,79$
Acetato de Etila	$58,08 \pm 6,39$	$64,08 \pm 8,34$
Clorofórmio	$45,13 \pm 8,38$	$51,81 \pm 8,23$
Éter Etílico	$51,09 \pm 5,68$	$53,32 \pm 9,12$

¹Valores médios $\pm$ coeficiente de variação obtidos a partir de $n = 10$ para cada solvente.

O método de precipitação de proteínas é considerado um procedimento de preparo de amostras com menor capacidade de remoção de interferentes endógenos quando comparado à extração líquido-líquido o que ocasiona com maior frequência efeito matriz (SHI et al, 2015). Os solventes mais utilizados com solventes precipitantes são o MeOH e a MeCN. SANTOS et al 2011, avaliou a eficiência da recuperação das Riparinas I e III de sangue de ratos Wistar através do método de precipitação de proteínas utilizando MeCN e MeOH, determinando a melhor eficiência do processo de extração utilizando a MeCN, ressaltando a necessidade de otimização do processo com intuito de diminuir o efeito matriz.

Como o efeito matriz é dependente da matriz biológica avaliada o método de extração de proteínas utilizando MeCN foi avaliado para o plasma.

Primeiramente foi avaliado o volume de acetonitrila de 600 μ L. Os resultados mostraram taxas de recuperação absolutas médias e coeficiente de variação para o analito de $73,78\% \pm 16,26$ e para o PI de $71,98\% \pm 12,34$ e

valores de efeito matriz de -32,06 para o analito e de -19,67 para o PI. Os resultados demonstram recuperações maiores que o método de extração líquido-líquido, no entanto efeito matriz significativos, revelando a presença de interferentes da matriz biológica o que pode ocasionar a não reprodutibilidade do método de extração.

A influência de interferentes na recuperação e coeficiente de variação do analito foi principalmente observada com as amostras de plasma hemolisado. Em seguida foi avaliado a proporção de MeCN, na ação precipitante adicionando ao método de extração concentrações de 400 e 500 µL de MeCN.

Os resultados mostraram menor efeito matriz e ruído da linha de base para o volume de 400 µL. Para este método, com o volume de 400 µL foi então avaliado a etapa de preparo do plasma pela adição de 80 µL ácido fórmico 0,1%, agitando em vórtex por 30 s, antes da adição da MeCN. Para este método de extração foi então avaliado a força de centrifugação em 12000 g e 16000 g. Os resultados mostraram coeficientes de variação menores e menor ruído na linha de base na rotação de 16000 g. A presença do ácido fórmico e aumento da força de centrifugação aumentou a recuperação da riparina I ($93,6\% \pm 5,73\%$) e PI (86,45%) e diminuiu o valores do efeito matriz de forma considerável -7,32 e -10,67 para analito e PI, respectivamente.

Desta forma o método de precipitação de proteínas utilizando MeCN com ácido fórmico a 0,1% como o solvente de precipitação final foi escolhido, pois apresentou maiores taxas de recuperação do analito, com menor quantidade de interferentes endógenos, e volumes que permitem usar LIQ menores.

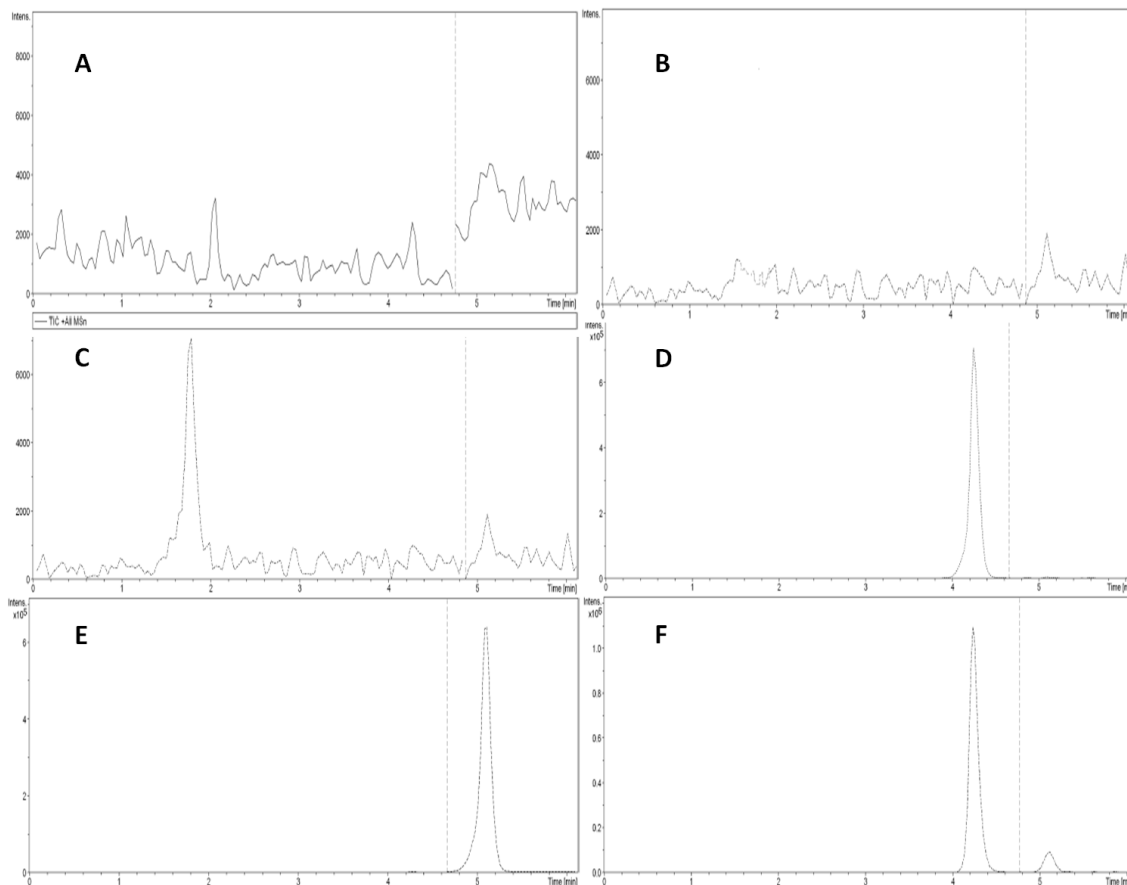
O padrão interno utilizado em um método bioanalítico não precisa ser estruturalmente relacionado ao analito, no entanto é importante que ele apresente o mesmo comportamento químico do analito no processo de extração e preparo da amostra. A análise dos dados dos processos de extração testados evidencia um comportamento semelhante entre as duas riparinas, de forma que a bipolarina B pode ser utilizado como padrão interno para no método para a quantificação da riparina I.

3.3. Validação do Método Bioanalítico

3.3.1. Seletividade

Os resultados obtidos para análise da seletividade do método bioanalítico utilizado podem ser observados na Figura 6. Através da análise dos cromatogramas podemos observar que não houve presença de picos interferentes no tempo de retenção correspondente a riparina I e ao PI, para amostras de plasma normal, amostras hemolisadas ou lipêmicas, plasma após contaminação com os analitos isolados e plasma com o analito na concentração do LIQ (5 ng /mL) e padrão interno na concentração de trabalho (50 ng/mL). A ausência de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e PI comprova a seletividade do método bioanalítico para quantificação deste analito em plasma.

Figura 6 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM para amostras branco de plasmas normal (A), lipêmico (B), hemolisado (C), plasma contaminado com riparina I (D), plasma contaminado com riparina B (E), plasma contaminado com PI (50 ng/mL) e analito no limite inferior de quantificação (5 ng/mL) (F) para avaliação da seletividade do método.



3.3.2. Recuperação e Efeito Matriz

A recuperação do processo de extração é fundamental para o bom desempenho e sensibilidade do método bioanalítico. Porcentagens de recuperação elevada diminuem os riscos de possíveis erros analíticos e desvios que possam surgir ao longo do processo, além de favorecerem LQ menores.

As recuperações médias e coeficientes de variação do método analítico nas três concentrações controle de qualidade CQB, CQM e CQA foram, $88,97\% \pm 6,47$, $91,69\% \pm 3,75$ e $95,32\% \pm 2,28\%$, respectivamente. A recuperação do padrão interno na concentração de trabalho foi de $81,56\% \pm 3,47\%$. Os resultados indicam a eficiência do método de extração com desvios dentro dos critérios de aceitação para validação do método.

A média do efeito matriz e coeficiente de variação para as concentrações controle utilizando CQB, CQM e CQA para amostras de plasma hemolisados foram $-11,06 \pm 6,67$, $-7,45 \pm 4,47$ e $-6,99 \pm 6,47\%$, respectivamente. Os resultados mostram que a supressão do íon do analito são insignificantes nas condições analíticas testadas, com valores de coeficiente de variação de $< \pm 15\%$. O efeito matriz normalizado para amostras de plasma incluindo plasma hemolisado nas concentrações CQB, CQM e CQA foram $87,32 \pm 8,45$, $93,21 \pm 6,98$ e $92,76 \pm 4,21\%$, respectivamente.

3.3.3. Linearidade

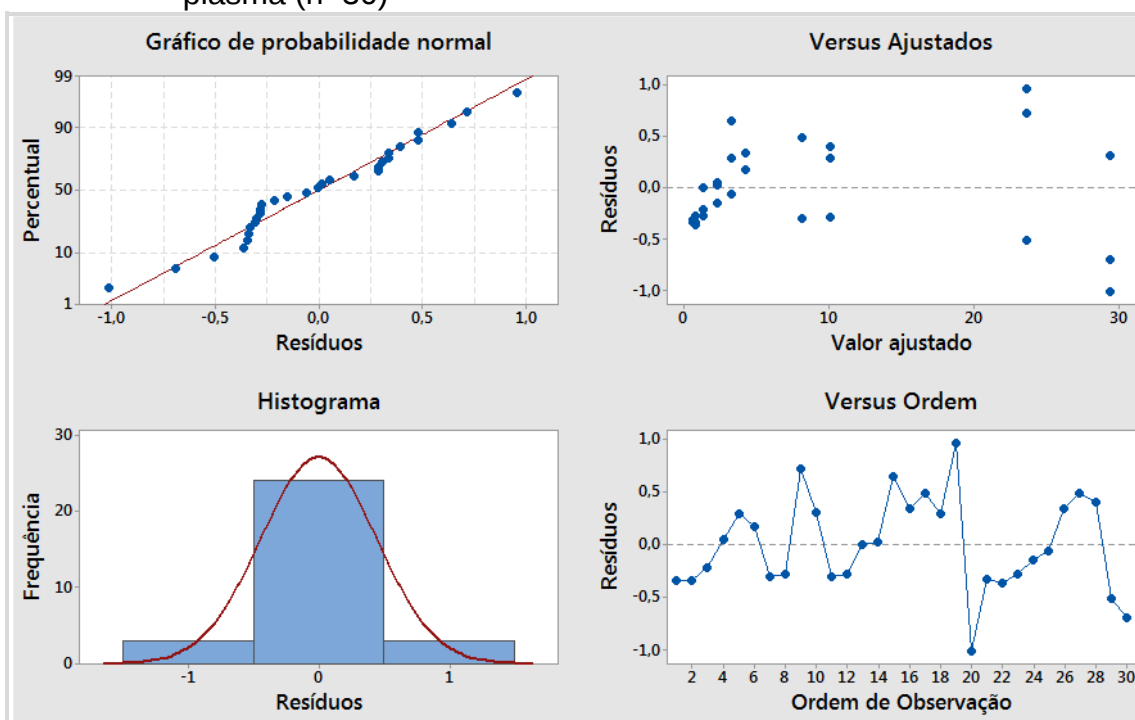
A Resolução - RDC 27/2012 (BRASIL, 2012) preconiza que os padrões de calibração só serão aceitos para construção das curvas de calibração se atenderem aos critérios referentes aos desvios máximos permitido para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ), o qual deve ser $\pm 20\%$ em relação à concentração nominal e aos demais níveis utilizados na curva para os quais o desvio máximo deve ser $\pm 15\%$. Estes critérios foram atendidos, os resultados dos desvios obtidos para o LIQ foi de $8,32\%$ e para os demais níveis os maiores desvios em relação ao valor nominal foram de $7,34\%$, permitindo

assim a construção e avaliação da linearidade do método através dos dados obtidos.

Os resultados obtidos pelo método dos mínimos quadrados para as três curvas de calibração, mostrou a existência de correlação positiva significativa entre o aumento da razão da intensidade do pico da riparina I com a riparina B (padrão interno) com coeficiente de correlação linear igual a 0,9975. A equação da regressão obtida para a média das curvas dos três dias $y = 0,03839x + 0,408$.

A aplicabilidade do modelo de ajuste linear foi avaliada através do gráfico dos resíduos (Figura 7). Os resultados mostram que os resíduos apresentam distribuição normal (valor $p = 0,131$), a regressão é significativa (valor $p = 0,000$) e não houve falta de ajustes para o modelo aplicado (valor $p = 0,149$).

Figura 7 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resíduos da regressão linear do método para determinação de teor de riparina I em plasma (n=30)



Desse modo, os parâmetros da reta, obtidos através do ajuste linear dos dados, são adequados para explicar o aumento de sinal do pico em função do aumento da concentração da riparina I nas amostras analisadas com intervalo de confiança de 95%.

3.3.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada por repetibilidade que avalia as variações intracorrída e a precisão intermediária que avalia as variações intercorridas. Ambas foram avaliadas considerando as cinco concentrações controle de qualidade (5,0; 10,0; 75,0; 100,0 e 600,0 ng/mL) em três dias diferentes. Os resultados obtidos para a repetibilidade e a precisão intermediária do método bioanalítico estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Repetibilidade e precisão intermediária, do método para determinação do teor de riparina I em plasma.

Concentração ng/mL	Dia	¹ Repetibilidade		² Precisão intermediária	
		Concentração	CV%	Recuperação %	CV%
5,0	1	4,78	6,80	4,83	8,20
	2	4,50	5,35		
	3	5,23	7,20		
10,0	1	9,34	6,32	9,34	5,58
	2	9,89	5,46		
	3	9,21	5,16		
75,0	1	73,69	5,66	77,21	5,25
	2	78,28	5,64		
	3	79,65	4,92		
100,0	1	104,88	4,89	102,71	5,56
	2	105,99	4,88		
	3	97,27	5,80		
600,0	1	585,78	3,82	593,03	2,12
	2	601,85	3,02		
	3	591,44	2,79		

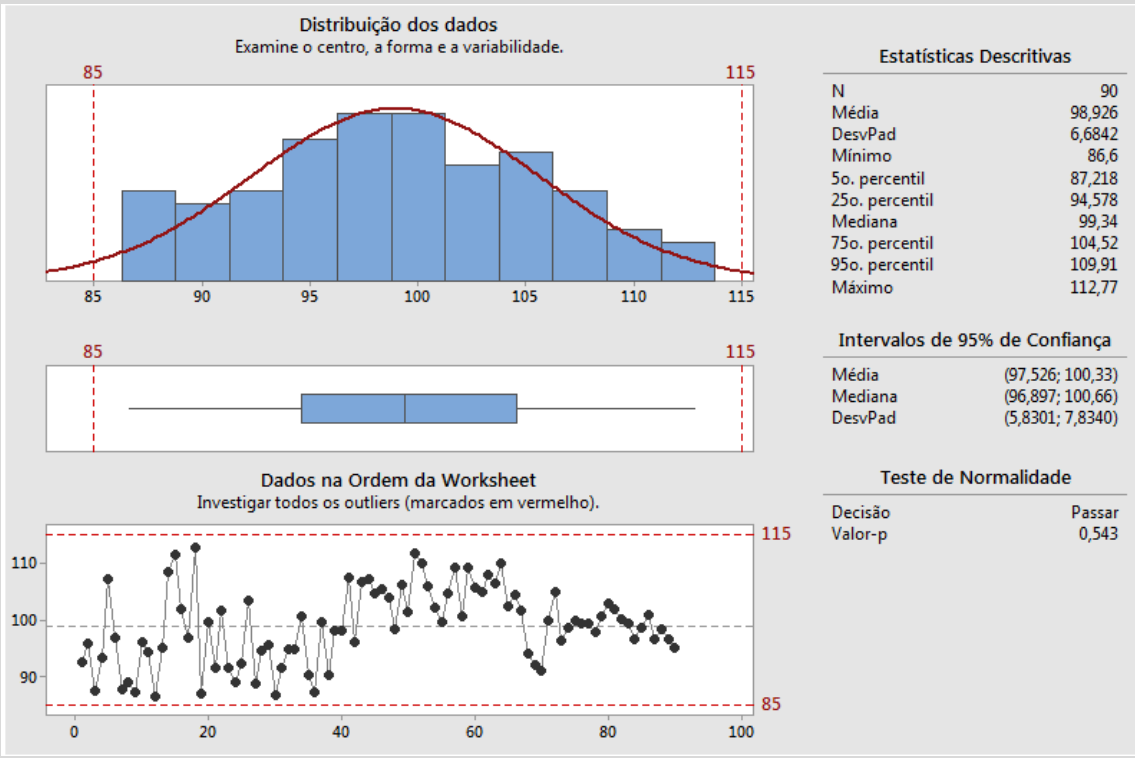
¹Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada dia. ²Valores médios obtidos a partir de n = 18 em cada concentração.

Os dados da precisão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 8), onde foi verificado que os mesmos cumprem com esse requerimento (valor p = 0,59), com nível de confiança de 95%.

A partir da análise dos dados, podemos verificar que o método proposto cumpre com os parâmetros de precisão avaliados, pois para todas as concentrações, inclusive para o LIQ, o coeficiente de variação foi menor que 8,2%, sendo permitidas variações de até 15% para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até 20%. Além disso, através da

análise de variância foi verificado que não houve diferença entre os diferentes níveis de concentração (valor $p = 0,543$), com nível de confiança de 95%.

Figura 8 – Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na precisão método para quantificação de riparina I em plasma ($n = 90$).



Diferenças estatisticamente significativas para valor $p \leq 0,05$ ($n = 90$).

3.3.5 Exatidão

Os resultados analíticos das concentrações controle de qualidade e os dias avaliados para a exatidão são os mesmos da precisão. Os dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento. – Exatidão do método para quantificação da riparina I em plasma.

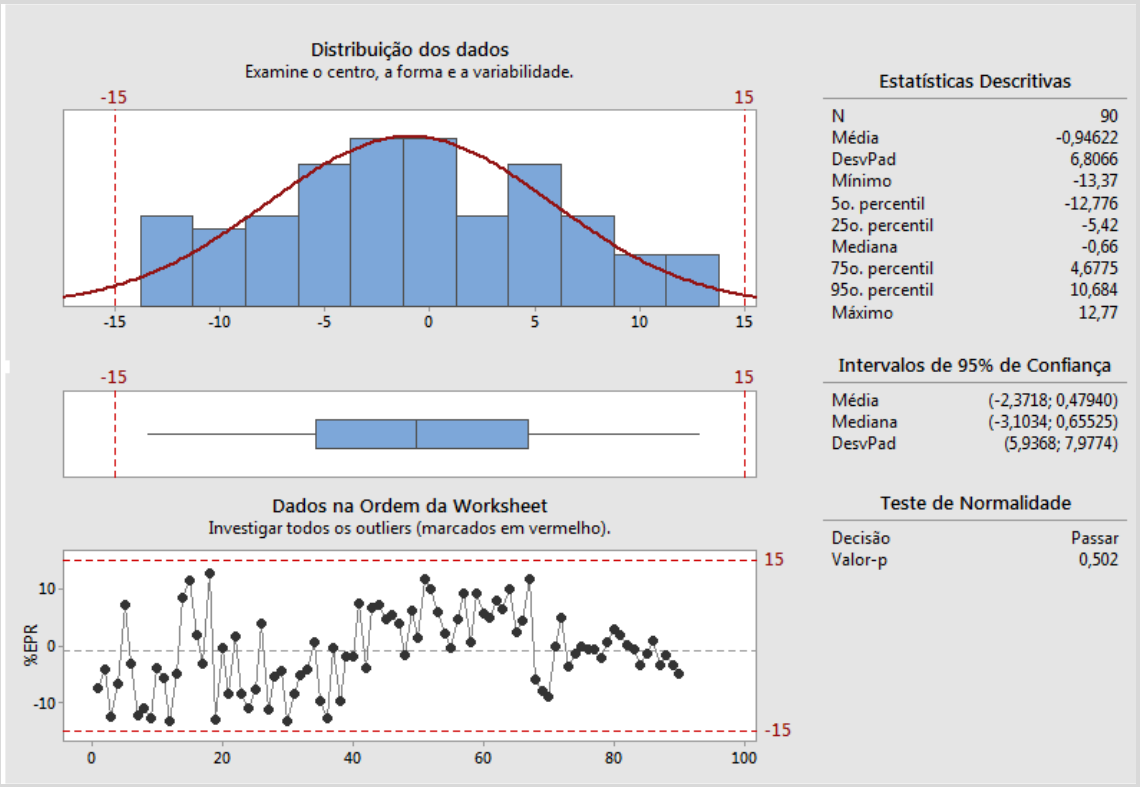
Concentração ng/mL ¹	Dia	¹ EPR Intra dia	² EPR Inter dia
5,0	1	-4,41	-3,25
	2	-9,80	
	3	4,46	
10,0	1	-6,59	-6,55
	2	-6,40	
	3	-6,63	
75,0	1	-3,83	2,95
	2	4,38	
	3	6,21	
100,0	1	4,89	5,01
	2	5,99	
	3	-2,74	
600,0	1	-1,43	-4,99
	2	0,31	
	3	-2,34	

¹Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada dia. ²Valores médios obtidos a partir de n = 18 em cada concentração.

Os resultados analíticos obtidos para a exatidão foram avaliados em relação a normalidade (Figura 9), confirmando com nível de confiança de 95% e valor p = 0,20, que os resultados apresentam distribuição normal.

Através da análise de variância foram avaliados os diferentes níveis de concentração, os resultados demonstram com nível de confiança de 95% e valor de p = 0,502 que não existem diferenças estatísticas entre os níveis (Figura 9). A análise estatística confirma que o método é exato, pois para todas as concentrações a maior variação no erro padrão relativo da média foi de - 9,80%, para o LIQ, sendo permitidas variações de até $\pm 15\%$ para todos os níveis a exceção do LIQ onde são admitidas variações de até $\pm 20\%$.

Figura 9 - Gráfico da avaliação de normalidade dos resultados obtidos na exatidão método para quantificação da Riparina I em plasma (n=90).



Diferenças estatisticamente significativas para valor $p \leq 0,05$ (n = 90).

3.3.6. Estabilidade da riparina I no plasma

A avaliação da estabilidade da analito na matriz biológica de estudo deve ser realizada, para que seja possível determinar o tempo no qual as amostras se mantêm inalteradas, nas condições utilizadas no método e na rotina do laboratório. Variações inferiores a 15% indicam que não há diferença significativa entre as concentrações das amostras recém-preparadas e amostras de estabilidade. Além disso, a precisão e exatidão da análise deve ser comprovadas pela obtenção de valores de desvio padrão relativo e erro padrão relativo inferiores a 15%.

3.3.6.1. Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento

Os dados da avaliação da estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento estão descritos na Tabela 4. Os resultados médios analíticos obtidos para as amostras dos três CQ após o último ciclo, não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos valores médios após o último ciclo com valor de $p > 0,05$, com nível de significância de 95%. O teste de estabilidade garante que as amostras do plasma contendo o analito podem ser congeladas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongeladas caso necessário, por três vezes.

Tabela 4 - Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA, após 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Concentração Nominal ng/mL	¹ Concentração Experimental	Exatidão EPR%	CV%	*Valor-p
10	9,63	-3,70	5,96	0,12
75	81,20	8,26	4,62	0,47
600	604,34	0,72	4,09	0,38

Valores estatisticamente significativos para ($p \leq 0,05$). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada concentração.

3.3.6.2. Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração avalia a possibilidade da amostra de plasma por motivos diversos permanecer na bancada, a temperatura ambiente, por um período de tempo determinado. O estudo evidenciou através dos dados obtidos na Tabela 5, que a amostra de riparina I em plasma pode permanecer por até 5 horas antes que seja submetida ao processamento, sem alteração na sua quantificação com precisão e exatidão confirmados por valores de CV% e ERP% inferiores a $\pm 15\%$.

Tabela 5 - Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de curta duração.

Concentração Nominal ng/mL	¹ Concentração Experimental	Exatidão EPR%	Precisão CV%	*Valor-p
10	9,73	-2,70	6,79	0,42
75	72,05	-3,99	5,36	0,37
600	573,94	-4,50	3,92	0,15

*Valores estatisticamente significativos para ($p \leq 0,05$). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada concentração.

3.3.6.3. Estabilidade longa duração

Através do estudo de longa duração avaliou-se a estabilidade da riparina I em plasma, armazenada sob temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de tempo de 30 dias. Os dados observados na Tabela 6 demonstram, que amostras de riparina I em plasma, podem permanecer por até 30 dias, antes que seja submetida ao processamento, sem alteração na sua quantificação com precisão e exatidão confirmados por valores de CV% e ERP% inferiores a $\pm 15\%$.

Tabela 6 - Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de longa duração.

Concentração	¹ Concentração	Exatidão	Precisão	
Nominal ng/mL	Experimental	EPR%	CV%	*Valor-p
10	9,63	-3,70	7,96	0,10
75	79,32	5,76	5,62	0,09
600	587,74	-2,04	6,06	0,42

Valores estatisticamente significativos para ($p \leq 0,05$). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada concentração.

3.3.6.4. Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento avalia a possibilidade da amostra de riparina I extraídas do plasma por motivos diversos ao ambiente laboratorial, permanecer no auto-injetor, a temperatura ambiente, por um período de tempo determinado. O estudo evidenciou através dos dados obtidos na Tabela 7, que a amostra de riparina I e PI podem permanecer por até 8 horas pós preparo, sem alteração na sua quantificação com precisão e exatidão confirmadas por valores de CV% e ERP% inferiores a $\pm 15\%$.

Tabela 7 - Estabilidade das concentrações CQB, CQM e CQA de pós-processamento.

Concentração	¹ Concentração	Exatidão	Precisão	
Nominal ng/mL	Experimental	EPR%	CV%	*Valor-p
10	9,28	-7,20	6,36	0,12
75	67,28	-10,29	4,93	0,45
600	570,27	-4,95	5,48	0,98

Valores estatisticamente significativos para ($p \leq 0,05$). ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 6$ em cada concentração.

3.3.7. Estabilidade PI e analito em solução

Os dados da avaliação da estabilidade das soluções estoque são mostrados na Tabela 8 e Tabela 9, onde é possível visualizar com precisão e exatidão, que a quantificação da riparina I e PI no plasma, com amostras de solução recém preparadas e após 15 horas de preparo não apresenta diferenças.

Tabela 8 - Estabilidade da solução estoque da riparina I armazenada a temperatura de -4 °C por 15 horas.

Concentração Nominal ng/mL	¹ Concentração Experimental	Exatidão EPR%	Precisão CV%	*Valor-p
10	9,78	-2,20	5,98	0,55
75	73,28	-2,29	3,76	0,19
600	598,27	-0,28	1,23	0,32

Valores estatisticamente significativos para Valor-p $\leq 0,05$. ¹Valores médios obtidos a partir de n = 6.

Tabela 9 - Estabilidade da solução estoque do PI armazenada a temperatura de -4 °C por 15 horas.

Concentração Nominal ng/mL	¹ Concentração Experimental	Exatidão EPR%	Precisão CV%	*Valor-p
50	49,23	-1,54	4,34	0,37

Valores estatisticamente significativos para Valor-p $\leq 0,05$. ¹Valores médios obtidos a partir de n = 3.

Na avaliação dos tipos de estabilidade preconizados empregando-se o método desenvolvido, observou-se que as amostras de plasma contendo a riparina I são estáveis por até 5 horas a temperatura ambiente, por 30 dias em freezer a -20 °C, por 12 horas no injetor automático após extração, e após três ciclos de congelamento/descongelamento de 24 horas. As soluções padrão

estoque de riparina I e PI são estáveis por até 15 horas sob refrigeração a temperatura de -4 °C.

4. Conclusão

Todos os parâmetros da validação bioanalítica foram atendidos verificando que os mesmos estavam dentro dos padrões estabelecidos na Resolução RDC 27/12 da ANVISA (BRASIL, 20012), de modo que o método pode ser considerado adequado para realização de estudos de quantificação da riparina I em amostras de plasma de ratos pelo método desenvolvido.

5. Referências

TOYOOKA T., Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabolomics, and metabolomics, **Journal Chromatography. Science**. 46, 233–247, 2008.

WANG, J. L. LIANG, Q. ZHANG, X. LI, Z., Preclinical pharmacokinetics, tissue distribution and excretion studies of a potential analgesic - corydaline using an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **J. Chromatography. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** 942–943, 70–76, 2013.

AGNESO, D., DENICOLO, A., SIMIELE, M., MOHAMED, A. A., BOGLIONE, L., DIPERRI, G., D'AVOLIO, A. Development and validation of a useful UPLC–MS/MS method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in peripheral blood mononuclear cells of HCVp patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 90C, 119–126, 2013.

XIONG, W., TAO, X., PANG, S., YANG, X., TANG, G., BIAN, Z. Separation and quantitation of three acidic herbicide residues in tobacco and oil by dispersive solid-phase extraction and UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatographic Science**.

MULLER, C.; SCHAFER, P.; STORTZEL, M.; VOGT, S.; WEINMANN, W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis mass spectra libraries. **Journal Chromatography B**, v.773, n. 1, p. 47-52, 2002.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas **Scientia Chromatographica** Vol.2, Nº1, 13-25, 2010.

ZHAO, L., X. SUN, Z. XIONG, S. WANG, Simultaneous determination of mosapride and its active des-p-fluorobenzyl and 4_-N-oxide metabolites in rat plasma using UPLC–MS/MS: an application for a pharmacokinetic study, *Talanta* 137, 130–135, 2015.

MAA, T., LI-JUAN, N., HONG-MEI, Li., QIANG, H., ZHANGB, Yu-Xin., CHENG-ZHU, W. Determination of isobavachalcone in rat plasma by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 107, 50–55, 2015.

CONCLUSÃO



- ✚ A determinação do perfil de impurezas por CLAE-DAD dos lotes de riparina I, RIP-1-5, apresentaram-se semelhantes, com impurezas inferiores a 1,0 % para todos os lotes;
- ✚ Os espectros de RMN de H^1 e C^{13} confirmaram os deslocamentos químicos característicos da riparina I, além disso os espectros de RMN de H^1 evidenciaram a presença de impurezas para os lotes RIP-2, RIP-3, RIP-4 e RIP-5 e ausência para a amostra RIP-1
- ✚ As bandas de absorção do espectro de IV foram características da molécula de riparina I;
- ✚ A MEV evidenciou lotes com hábitos cristalinos distintos;
- ✚ As técnicas termoanalíticas DSC e TG evidenciaram comportamentos térmicos distintos para os lotes, possivelmente por alteração no processo de síntese e presença de impurezas. Além disso, foi possível observar na análise DSC para os lotes RIP-2 e RIP-3 comportamento térmico característico de cristais com hábitos cristalinos distintos;
- ✚ Os difratogramas DRX obtidos para os lotes corroboram com a presença de estruturas cristalinas distintas, evidenciando picos no eixo 2θ característicos apenas para o lote RIP-2 e RIP-3;
- ✚ Os espectros de RMN ^{13}C revelam sinais de carbonos intrínsecos da molécula da riparina I, evidenciando para os lotes RIP-2 e RIP-3 a presença de carbono metilado inferindo a presença de impurezas do processo de síntese;
- ✚ A ionização química da riparina I foi determinada dentro do conceito do Quality by Design (QbD) fornecendo informações importantes para

trabalhos com a riparina I e outros fármacos que possam ser quantificados concomitantemente;

- ✚ O método de extração de riparina I por precipitação de proteínas utilizando 400 µL de MeCN acidificada com ácido fórmico a 0,1% foi adequado para a obtenção da riparina com recuperação adequada e menor interferentes da matriz;
- ✚ A riparina I apresentou estabilidade em plasma por um período de 5 horas a temperatura ambiente, estabilidade pós-processamento a temperatura ambiente por um período de 8 horas. As amostras de riparina I em plasma podem ser armazenadas por um período de 30 dias a – 20 °C em freezer, sendo estáveis ainda após três ciclos de congelamento e descongelamento nesta temperatura. As soluções de riparina I e riparina B em MeCN são estáveis a temperatura de – 4 °C por 15 horas;
- ✚ O método analítico desenvolvido para a quantificação de riparina I em plasma de ratos wistar atendeu a todos os parâmetros de validação exigidos na resolução RDC 27 de 2012 da ANVISA podendo ser utilizados nos estudos farmacocinéticos.

PERSPECTIVAS

- ✚ Realizar estudo de cristal único para confirmar estrutura polimórfica da Riparina I;
- ✚ Realizar estudos de pré-fórmulação para avaliar a influência dos diferentes hábitos cristalinos nas propriedades de dissolução, fluidez e mecânicas;
- ✚ Realizar estudo de biodisponibilidade da riparina I utilizando o método bioanalítico validado.

REFERÊNCIAS

A.D.S. MARQUESA,1, C. ZHENG, C.T. LINA,*, Y. TAKAHATA, M. BARBOSA-FILHO, S.J.C. GUTIERREZ; Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III; **Journal of Molecular Structure** 753, 13–21, 2005.

A.G. ASIMAKOPOULOS, N.S. THOMAIDIS, M.A. KOUPPARIS, Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol, **Toxicol. Lett.** 210, 141–547, 2012.

AGNESOD, D., DENICOLA, A., SIMIELE, M., MOHAMEDABDI, A., BOGLIONE, L., DIPERRI, G., D'AVOLIO, A. Development and validation of a fast UPLC–MS/MS method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in peripheral blood mononuclear cells of HCV patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 90C, 119–126, 2013.

ALSHAMMARI T.M. , AL-HASSAN, A.A., HADDA T., ALJOFAN M.; Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis; **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.8, n.1, p. 195-206, 2001.

ANNELI KRÜVE, RIIN REBANE, KARIN KIPPER, MAARJA-LIISA OLDEKOP, HANNO EVARD, KOIT HERODES, PEKKA RAVIO, IVO LEITO, University of Tartu, Institute of Chemistry, Ravila 14a, 50411 Tartu, Estonia b Finnish Customs Laboratory, Tekniikantie 13, PL 53, FI-02151 Espoo, Finland, **Analytica Chimica Acta** 870, 29–44, 2015.

ARAUJO, F.L.; MELO, C.T.; ROCHA, N.F. ; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (Riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. Naunyn-Schmiedeberg's **Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 337-344, 2009.

B.W. BROOKS, D.B. HUGGETT, Human Pharmaceuticals in the Environment. Current and Future Perspectives, **Springer**, New York, 2012.

BARBOSA, R. C. S. B.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1/2, p. 91 - 94, 1988.

BARBOSA-FILHO J.M., YOSHIDA M, GOTTLIEB O. R. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. **Revista Latino Americana Quimica**, 21, 5– 7, 1990.

BARBOSA-FILHO JM, YOSHIDA M, GOTTLIEB OR, BARBOSA R.C.S.B.C., GIESBRECHT AM, YOUNG CM. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia* . **Phytochemistry**, 26:2615–7, 1987.

BERNARDI, L. S., FERREIRA, F. F., CUFFINI, S. L., CAMPOS, C. E. M., MONTI, G. A., KUMINEK, G., OLIVEIRA, P. R., CARDOSO, S. G. Solid-state evaluation and polymorphic quantification of venlafaxine hydrochloride raw materials using the Rietveld method. **Talanta** 117, 189–195, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de maio de 2012.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of chromatography B: Biomedical applications**, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.

CASSIANO N. M., BARREIRO J. C., MARTINS L. R. R., REGINA VINCENZI OLIVEIRA R. V., CASS Q. B.; Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas; **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 1021-1030, 2009.

CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAUJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.19(3), p. 197-202, 2000.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CROFT, N.P.; PURCELL, A.W.; TSCHARKE, D. C.; Quantifying epitope presentation using mass spectrometry. **Molecular Immunology** 68, 77–80, 2015.

DATTA, S.; GRANT, D.J.W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.1, p.42-57, 2004

DAVIS, A. M.; RILEY, R. J. Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities. **Current Opinion in Chemical Biology** 8, 378, 2004.

EECKHAUT, A.V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p.2198-2207, 2009.

GUO, Y., SHALAEV, E., SMITH, S. Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. **Trends in Analytical chemistry**, 49, 137–144, 2013.

GUO, Y., SHALAEV, E., SMITH, S. Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. **Trends in Analytical chemistry**, 49, 137–144, 2013.

ICH, Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), current step 4th version, October 25, 2006.

J. WANG, L. LIANG, Q. ZHANG, X. LI, Z. FU, Preclinical pharmacokinetics, tissue distribution and excretion studies of a potential analgesics - corydaline using an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** 942–943, 70–76, 2013.

KUMINEK, G., RAUBER, G. S., RIEKES, M. K., CAMPOS, C. E. M., MONTI, G. A., BORTOLUZZI, A. J., CUFFINI, S. L., CARDOSO, S. G. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 78– 79, 105– 111, 2013.

LANÇAS F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas, **Scientia Chromatographica**; 5(1):27-46; 2013

LEITE C. P. Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de Aniba riparia (nees) mez (lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, CE, 2008.

M. SUN, L. BAI, G.J. TERFLOTH, D.Q. LIU, A.S. KORD, Matrix deactivation: a general approach to improve stability of unstable and reactive pharmaceutical geno-toxic impurities for trace analysis, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 52, 30–36, 2010.

M.D. ARGENTINE, P.K. OWENS, B.A. OLSEN, Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 59, 12–28, 2007.

M.M. HENDRIKS, J.H. DE BOER, A.K. SMILDE, Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical Technological Products, **Elsevier**, 1996.

MALDANER, L. JARDIM I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 214-222, 2009

MARQUES, C.A. Importancia economica da familia Lauraceae. **Lindl. Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M.; **Anal. Chem.** 75, 3019, 2003.

MILMAN, B.L.; General principles of identification by mass spectrometry; **Trends in Analytical Chemistry** 69, 24–33, 2015.

MILMAN, B.L.; ZHURKOVICH I.K.; Identification of toxic cyclopeptides based on mass spectral library matching, **Anal. Chem.** 8–15, 2014.

MIRANDA T. A. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos e em plasma humano. Belo Horizonte. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2013.

NIESSEN, W.M.A. Advances in instrumentation is liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid introduction techniques. **J. Chromatogr. A**, v.794, p.407-435, 1998.

PACHLA L. A., EISEMAN L. A., REYNOLDS D. L., JOHNSON E. L., DAFTSIOS A. C.; A validated liquid chromatographic method for the antiallergy agent CI-922 in dog and rat plasma; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; Volume 4, Issue 4, Pages 491-496, 1998.

PATEL, J. R.; CARLTON, R. A.; NEEDHAM, T. E.; CHICHESTER, C. O.; VOGT, F. G. Preparation, structural analysis, and properties of tenoxicam cocrystals. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 685–706, 15 out. 2012b.

RIBANI M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C.; Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos; **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

SAAR, E.; GEROSTAMOULOS, D.; DRUMMER, O.H.; BEYER, J. Comparasion of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsycotics in human blood. **Analytical Bioanal. Chem.**, v. 393, p.727-734, 2009.

SANTOS S. G., QUEIROGA K. F., OLIVEIRA A. M. F., TAVARES J. F., GUTIERREZ S. J. C., DINIZ M. F. F. M. D., BARBOSA-FILHO J. M., SILVA M. S.; Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from Aniba riparia (Nees) Mez. (Lauraceae); **Talanta** 86, 233– 240, 2011.

SANTOS S. O., ALVES M.; Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira; **Revista Brasileira de Biociências**; Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 14-28, jan./mar. 2013.

SANTOS, M., GARCÍAB L. C., CHECURAA, C., DONADÍO, L. G., FERNANDEZ, C., ORGUEIRA, H. Synthesis and characterization of new

related substances of the antiarrhythmic drug dronedarone hydrochloride, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 114, 441–446, 2015.

SANTOS, M., GARCÍA L. C., CHECURAA, C., DONADÍO, L. G., FERNANDEZ, C., ORGUEIRA, H. Synthesis and characterization of new related substances of the antiarrhythmic drug dronedarone hydrochloride, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 114, 441–446, 2015.

SEIXAS, S.R.S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. João Pessoa. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba. 103p. 1996.

SHAH, V. The history of bioanalytical method validation and regulation: evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The AAPS Journal**, vol 9 (1), article 5, 2007.

SOUSA F. C. F., CARLA T. V. MELO,¹ MARIA C. O. CITÓ, FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE FÉLIX, SILVÂNIA M. M. VASCONCELOS,¹ MARTA M. F. FONTELES, JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO, GLAUCE S. B. VIANA; Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais; **Revista Brasileira de Farmacognosia**; 18(4): 642-654, Out./Dez. 2008.

STEWART, I.I., Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. **Spectr. Acta B**, v.54, p.1649-1695, 1999.

T. TOYO'OKA, Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabolomics, and metabolomics, **J. Chromatogr. Sci.** 46 233–247, 2008.

THOMAS G, CASTELO-BRANCO UJV, BARBOSA-FILHO JM, BACHELET M, VARGAFTIG BB 1994. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **J Pharm Pharmacol** 46: 103-107, 1994.

WANG, H.Y. HUA, H.Y.; LIU, X.Y.; LIU, J.H.; YU, B.Y.; *In vitro* biotransformation of red ginseng extract by human intestinal microflora: Metabolites identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 98, 296-306, 2014.

XIAOJING YANG, XUEWU XIONG, JI CAO, BAOLEI LUAN, YONGJUN LIU, GUOZHU LIU, LEI ZHANG ; Matrix precipitation: A general strategy to eliminate matrix interference for pharmaceutical toxic impurities analysis ; **Journal of Chromatography A**, 1379, 16–23, 2015