



Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea

Joanna Cristina Silva Bastos¹; Luiz Carlos da Cunha¹; Elissa Arantes Ostrosky^{1,*}

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, Brasil

RESUMO

Este artigo aborda a validação de um método analítico para determinação, em amostras de microdiálise, de 4-nerolidilcatecol (4-NRC), uma substância natural extraída da *Piper umbellata* (*Piperaceae*) com comprovada atividade antioxidante. O sistema de cromatografia líquida (CLAE-PDA Shimadzu LC 20AT, bomba LC-20AT, injetor com *autosampler* SIL-20A) foi acoplado a uma coluna C18 (Phenomenex® Synergi Fusion 4μ RP-80³, 150 x 4,6 mm). A fase móvel constituiu-se de acetonitrila, metanol e água (54:20:26, v:v:v), sob fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com detecção a 280 nm, volume de injeção 30 μL e tempo de corrida 15 minutos. O método foi linear para concentrações de 5,0-200,0 μg mL⁻¹ (r = 0,9996). Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 1,35 e 4,5 μg mL⁻¹. A precisão (DPR <5,0%) e exatidão (99,0 – 112,0%) ficaram dentro dos valores recomendados pela ANVISA. A robustez foi garantida medindo-se a influência da variação do fluxo e da proporção de acetonitrila da fase móvel. As amostras de albumina enriquecidas com 4-NRC e submetidas ao processo de extração apresentaram recuperação de 69 a 95%. O método desenvolvido pode ser aplicado à análise de 4-NRC, com finalidade de estudos de microdiálise cutânea, devido aos adequados parâmetros de validação obtidos.

Palavras-chave: 4-nerolidilcatecol. Estudos de validação. Matriz biológica.

INTRODUÇÃO

A espécie *Piper umbellata* (*Piperaceae*), conhecida popularmente como pariparoba, capeba e malvisco, é uma planta arbustiva, de ocorrência pantropical. De estrutura feniliterpenoídica e biossíntese mista, o 4-nerolidilcatecol,

4-NRC (Figura 1) representa o metabólito secundário majoritário das folhas e raízes desta espécie para o qual são atribuídas variadas ações biológicas (Baldoqui et al., 2009; Soares, 2007; Valadares et al., 2007; Silva et al., 2005; Ropke et al., 2005; Ropke et al., 2003). Estudos comprovaram a ação antioxidante, anti-inflamatória e quimioprotetora, com expressiva ação fotoprotetora deste principal constituinte (Soares, 2007).

Demonstrou-se que a aplicação do extrato liofilizado de raízes da planta possui atividade antioxidante maior que o α -tocoferol aplicado nas mesmas condições, sugerindo o emprego deste extrato em formulações tópicas, com o objetivo de combater os efeitos danosos causados por radicais livres, prevenindo o envelhecimento cutâneo (Ropke et al., 2005). Assim, formulações como gel, creme e protetor solar contendo extrato de *Piper umbellata*, têm tido uma aplicação importante na área cosmética e terapêutica (Baldoqui et al., 2009).

Em amostras biológicas, vegetais e farmacêuticas a quantificação de substâncias ativas tem sido comumente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Barrios et al., 2011; Couto et al., 2011; Silva et al., 2010) por ser um método rápido e versátil, com as vantagens da automação e disponibilidade nos laboratórios analíticos (Collins et al., 2006). Colunas de fase estacionária apolar (C8, C18, Sephadex LH20) e fases móveis com elevado teor de solventes orgânicos são frequentemente utilizadas para a separação e quantificação dos componentes com boa resolução, eficiência e sensibilidade (Lanças, 2009; Collins et al., 2006). Os detectores comumente empregados para análise do 4-NRC são o ultravioleta (Silva et al., 2005; Rezende & Barros, 2004) ou eletroquímico (Noriega et al., 2008; Ropke et al., 2005; Ropke et al., 2003). Entretanto, o método de CLAE acoplado ao detector de arranjos de fotodiodos (CLAE-PDA) ainda não foi descrito na literatura, para quantificação do 4-NRC em amostras biológicas, e apresenta vantagens expressivas quanto à seletividade e à capacidade de identificação de padrões analíticos em relação ao tempo de retenção e espectro UV-Vis (Rodrigues et al., 2006).

A identificação e a quantificação de compostos desconhecidos em diferentes matrizes biológicas é uma

Autor correspondente: Elissa Arantes Ostrosky - Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) - Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás (UFG) - e-mail: aranteselissa@gmail.com

tarefa desafiadora, por necessitar de uma seleção que abrange, muitas vezes, substâncias tóxicas para alcançar um resultado válido e confiável. Com essa finalidade, a técnica de CLAE-PDA oferece muitas vantagens em termos de sensibilidade, rapidez, seletividade e robustez, com uma aplicação versátil e grande potencial quantitativo (Lambert et al., 1997).

A microdiálise consiste em mimetizar a função de um capilar sanguíneo, compreendendo uma pequena sonda de diálise que contém membrana semipermeável implantada no tecido alvo, por exemplo, a derme. Um fluxo constante através da sonda cria gradiente de concentração ao longo da membrana, permitindo a difusão passiva dos compostos do fluido intersticial para o líquido que perfunde o interior da sonda, como observado na Figura 2. O parâmetro principal da difusão é expresso como a recuperação relativa (RR), que é a razão entre a concentração do dialisado e a concentração do meio que circunda a sonda (Groth & Jurgensen, 1997).

Essa técnica tem sido frequentemente empregada em estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos, por possibilitar a amostragem de substâncias presentes no líquido do espaço intersticial (biofase) em praticamente qualquer órgão ou tecido (Rittenhouse et al., 1998; Muller et al., 1997; Wang et al., 1993), sendo o dialisado coletado continuamente e, posteriormente, quantificado em tempo real (Plock & Kloft, 2005). Entretanto, devido à perfusão constante na sonda de microdiálise, a transferência de fármaco pela membrana da sonda e o equilíbrio entre o fluido tecidual e o dialisado (condição *sink*) são incompletos (Bettoni, 2009), sendo necessária a calibração da sonda para determinar a quantidade da substância que realmente pode ser recuperada pela técnica de microdiálise. A recuperação obtida *in vitro* representa a fração da quantidade total da substância no tecido que pode ser extraída pela sonda na situação *in vivo*. A difusão obedece aos princípios da Lei de Fick e fatores como o coeficiente de partição, tamanho da partícula e a área superficial das substâncias afeta a permeabilidade da membrana (Schuck et al., 2004).

Para muitos fármacos como esteroides, antineoplásicos, cetoconazol e tretinoína (ácido retinoico), com massa molecular elevada e/ou características lipofílicas (Whitaker & Lunte, 2010; Schuck et al., 2004), há menor perspectiva de recuperação, já que a solubilidade destes no fluido de perfusão é baixa, podendo ocorrer retenção do fármaco à tubulação da sonda. Como também, alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (Schuck, et al., 2004), além de elevar a relação *perda/ganho* determinando-se a dificuldade da recuperação real *in vivo* (Araújo et al., 2008; Groth & Jorgensen, 1997).

Sendo assim, as propriedades físico-químicas do 4-NRC, como a baixa solubilidade em água ($3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), coeficiente de partição relativamente elevado ($\log P = 6,997 \pm 0,37$) e baixa fotoestabilidade (Soares, 2007), ainda são um grande desafio à aplicação terapêutica. Entretanto, diferentemente das técnicas tradicionais, a microdiálise pode ser uma alternativa promissora em estudos de permeação através do tecido cutâneo, pois gera informações contínuas sobre gradientes de concentração de fármacos em diferentes camadas da pele, além de ser pouco invasiva, de baixo custo e fácil utilização (Araújo et al., 2008).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi validar um método analítico aplicável à recuperação e

quantificação do 4-NRC em solução de proteína plasmática (BSA) por CLAE-PDA. Segundo critérios previamente estabelecidos (Brasil, 2003; FDA, 1994), antecipando passos importantes para estabelecer parâmetros adequados da técnica de microdiálise que investigue a permeação e/ou a biodisponibilidade de substâncias lipofílicas no tecido cutâneo, a partir de formulações farmacêuticas ou cosméticas aplicadas topicamente.

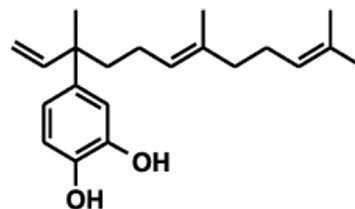


Figura 1. Estrutura química 4-NRC

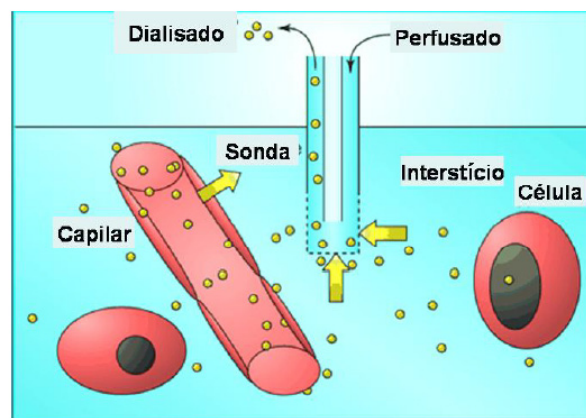


Figura 2. Diagrama de uma sonda de microdiálise. Adaptado de (http://www.bmj.com/highwire/filestream/407418/field_highwire_fragment_image_1/0/F2.large.jpg)

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra e reagentes

O 4-NRC foi extraído e purificado a partir do extrato bruto etanólico de raízes de *Piper umbellata* (Flora Medicinal) no Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BIOPK) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (Gustafson et al., 1992). A purificação da fração hexânica foi realizada por cromatografia preparativa utilizando-se Sephadex® (49x920mm) como fase estacionária e hexano: diclorometano: metanol (20:50:10, v:v:v) como fase móvel. As frações coletadas, após evaporação do solvente, foram pesadas e analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando clorofórmio: etanol (95:5, v/v) como fase móvel, e em seguida foram analisadas sob radiação ultravioleta, comprimento de onda 254 nm e reveladas com vanilina ácida 1%.

Os solventes empregados foram metanol e acetonitrila grau cromatográfico (J.T. Barker) e clorofórmio grau analítico (FMAIA). O plasma empregado nos experimentos de recuperação foi doado pelo Instituto

Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). A água ultrapura foi obtida em sistema ultrapurificador de água (Gehaka Master P&D), com condutividade de 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C).

Desenvolvimento do método analítico e condições cromatográficas

O desenvolvimento do método teve início a partir de testes entre proporções de solventes que conferiram maior pureza e menor fator de cauda ao pico cromatográfico. Os solventes orgânicos utilizados foram escolhidos pelas características lipofílicas do analito, sendo necessária uma fase móvel com alto coeficiente de eluição. Os testes originaram fase móvel com proporção final de acetonitrila:metanol:água 54:20:26 (v:v:v), que posteriormente foi filtrada, degaseificada e submetida a um fluxo de 1,0 mL min^{-1} . O cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu LC 20AT) empregado compunha-se de bomba LC-20AT, injetor com autoamostrador SIL-20A e detector de arranjo de fotodiodos (PDA), comprimento de onda de 282 nm, no qual o analito apresentou pico máximo de absorvância. A separação cromatográfica foi obtida utilizando coluna Phenomenex® Synergi Fusion 4 μ RP-80A C18 (150 x 4,6 mm). O volume de injeção foi de 30 μL , com o tempo total de corrida de 15 minutos.

Preparo da amostra

A solução estoque de 4-NRC (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em metanol grau CLAE, originando sete soluções de trabalho com as concentrações 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em fase móvel. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar para proteção contra incidência da luz e mantidas por sete dias em freezer a -20 ± 2 °C.

Avaliação da adequação do sistema

A adequação do sistema foi avaliada durante a corrida cromatográfica de acordo com Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods (FDA, 1994). Os parâmetros cromatográficos observados foram pratos teóricos (N), fator de cauda (T) do 4-NRC, assim como a repetitividade do pico realizada com a área da concentração de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (expresso pelo desvio padrão relativo, DPR; n = 6).

Validação do método analítico para quantificação de 4-NRC em solução de proteína plasmática (BSA)

Os parâmetros considerados na validação do método foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez e seguiram as recomendações do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” (Brasil, 2003).

Seletividade

Em métodos cromatográficos, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos, pode-se avaliar a pureza

do pico cromatográfico por meio da verificação de possíveis interferentes à substância de interesse no mesmo tempo de retenção do analito em estudo. A seletividade do método foi avaliada mediante comparação dos cromatogramas de BSA submetida ao processo de extração, na ausência e presença de 4-NRC. Adicionalmente, avaliou-se a pureza de três pontos do pico cromatográfico atribuído ao 4-NRC, comparando-se os espectros de UV obtidos no início e no fim da eluição.

Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção da curva de calibração a partir de triplicatas diárias de sete concentrações diferentes (5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A equação da reta ($y = ax + b$) foi determinada calculando-se o intercepto (b), a inclinação (a) e o coeficiente de correlação linear (r). A linearidade foi avaliada em três dias diferentes e estimada por análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Limites de detecção e de quantificação

A estimativa do limite de detecção foi realizada com base na razão sinal-ruído equivalente a três vezes o ruído da linha de base. O limite de quantificação também foi determinado com base na mesma relação sinal-ruído embora na razão superior a 10:1.

Precisão e exatidão

A precisão (intra e inter-ensaio) do método foi determinada em três dias diferentes, com triplicatas diárias de amostras com concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão do método analítico foi expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão foi realizada por ensaios em triplicatas diárias de amostras com concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos devem ser diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste. A exatidão foi expressa de acordo com a **Equação 1**:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CEM}}{\text{CT}} \cdot 100$$

em que CEM é concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

Robustez

Para a avaliação da robustez, examinou-se o impacto de pequenas variações das condições analíticas do método. Os parâmetros avaliados foram variação da proporção de acetonitrila na fase móvel (52, 54 e 56%) e do fluxo (0,95; 1,00 e 1,05 mL min^{-1}). Os efeitos de tais alterações sobre os parâmetros tempo de retenção e área dos picos foram observados.

Aplicabilidade do método

Para avaliar a recuperação de 4-NRC em amostras dialisadas, foram adicionados 100 µL de solução estoque de 4-NRC na solução perfusante de BSA (*Ringer*: glicose:BSA 94,9:0,1:5,0 v:p:p), obtendo as concentrações teóricas de 7,5; 10,0 e 15,0 µg mL⁻¹. Estas concentrações foram definidas previamente no estudo de calibração da sonda de microdialise, em virtude de concentrações maiores ficarem retidas na tubulação, dificultando a recuperação relativa do ativo em estudo. Aliquotas do dialisado (60 µL) foram submetidas à extração líquido-líquido pela adição de clorofórmio (600 µL), agitação em vórtex (10 minutos) e centrifugação (10 minutos, 6000 rpm). A fração orgânica (480 µL) foi transferida para *vial*, evaporada em atmosfera de nitrogênio e ressuspensa em fase móvel (120 µL) com posterior injeção (30 µL) em CLAE-PDA, nas condições anteriormente descritas (Brasil, 2003; FDA, 1994) e comparadas com as concentrações reais da curva de calibração obtida.

Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados testes de regressão linear e análise de variância (ANOVA), utilizando o *software* SPSS versão 15.0 sob IC 95%. Consideraram-se diferenças significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação de adequação do sistema

Os resultados do teste de adequação do sistema estão descritos na Tabela 1, na qual também podem ser observados os valores relativos às especificações da literatura (FDA, 1994). A resolução não foi determinada devido à inexistência de outro pico cromatográfico.

Tabela 1. Dados do teste de adequação do sistema cromatográfico para determinação do 4-NRC em amostras de microdialise

	T	N	Repetibilidade (DPR%, n=6)
4-NRC	2,0	4701,5	0,85%
Especificação*	≤ 2,0	> 2000	< 1,0%

T: fator de cauda; N: pratos teóricos; * FDA Guide

Validação do método por CLAE-PDA

Seletividade

O pico cromatográfico de 4-NRC obtido pode ser atribuído a um único componente com elevada pureza de 99,14%, 99,58% e 99,36%, em três pontos do pico cromatográfico (*upslope*, *downslope* e *top*), respectivamente (Figura 3).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas de BSA na ausência de 4-NRC em relação ao cromatograma de uma solução de 4-NRC, conforme demonstrado na Figura 4.

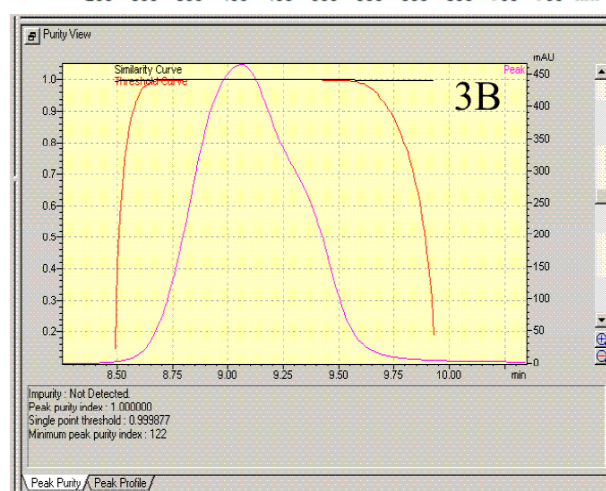
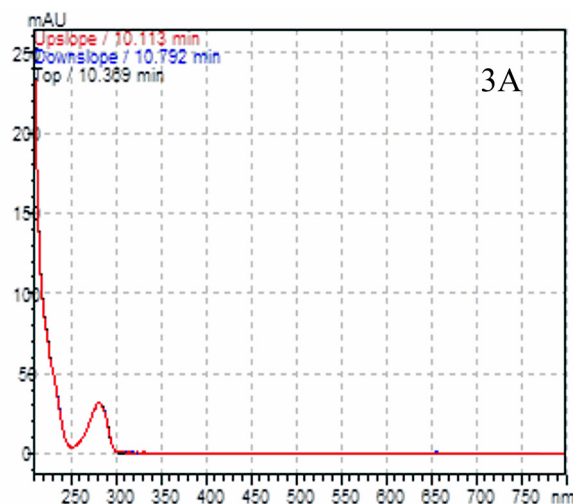


Figura 3. Espectro de UV do 4-NRC gerado pelo PDA (3A) e seu respectivo pico de pureza (3B)

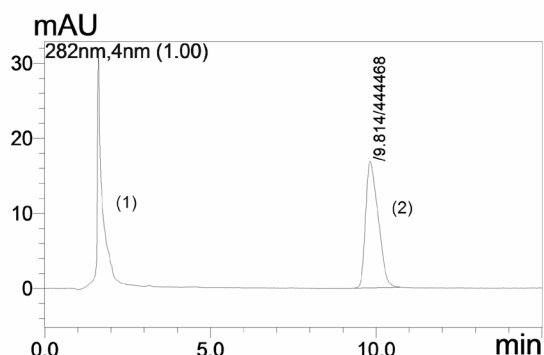


Figura 4. Cromatograma de BSA (1) e de 4-NRC (2) após processo de extração

Linearidade

Os cromatogramas das concentrações de 4-NRC estão representados na Figura 5. A linearidade do método foi expressa pelas curvas de calibração na faixa de 5,0 a 200 µg mL⁻¹, quando o sinal analítico (variável dependente y) foi linearmente proporcional à sua concentração (variável independente x) (Ribeiro et al., 2008).

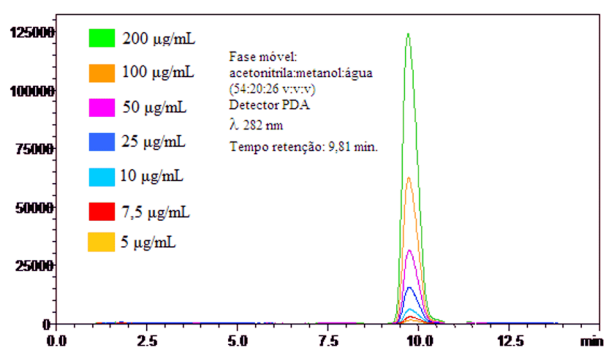


Figura 5. Cromatogramas de 4-NRC no intervalo de 5,0 a 200,0 µg mL⁻¹

As curvas de calibração obtidas em três dias distintos resultaram na curva média $y = 15400x - 10166$ e o valor médio de coeficiente de correlação linear (r) $0,9997 \pm 0,000173$, visto que não há diferença estatística significativa entre os mesmos ($p < 0,001$), em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003).

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão, avaliadas a partir de todas as concentrações do intervalo linear do método, em triplicata, durante três dias distintos, resultaram em valores inferiores a 4,0% (precisão), assim como as concentrações determinadas experimentalmente estão contidas no intervalo de 80 a 120% da concentração teórica do analito (exatidão), de acordo com a Tabela 2. Dessa forma, os valores de precisão e exatidão atendem a RE 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003). De acordo com a análise de variância ANOVA, verificou-se inexistência de diferença significativa entre os valores de precisão intra-dia e inter-dias ($p < 0,05$).

Tabela 2. Dados de precisão e exatidão analíticas para quantificação do 4-NRC por CLAE-PDA

Concentração (µg mL ⁻¹)	Média da área do pico*	Desvio padrão	DPR% inter-corridas	DPR% intra-corrída	Exatidão %
5	76502	3611	3,91	1,83	112,6
7,5	107366	2664	2,10	0,74	101,73
10	142651	812	2,42	2,27	99,20
25	371318	9929	2,66	1,54	99,08
50	741977	8284	2,23	2,14	97,68
100	1542160	13660	1,48	1,37	100,8
200	3068222	129162	3,91	1,64	99,95

*Média de, no mínimo 06 injeções; DPR= desvio padrão relativo

Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados pelo ruído da linha de base foram, respectivamente, 1,35 e 4,5 µg mL⁻¹.

Robustez

Avaliou-se a influência da variação do fluxo e da proporção de acetoneitrila no tempo de retenção e na concentração de uma solução de 4-NRC a 50 µg mL⁻¹ (Tabela 3). A análise estatística pelo método de regressão linear demonstrou que não houve diferença significativa no método desenvolvido ($p < 0,05$), devido às alterações no fluxo e na composição da fase móvel.

Tabela 3. Variação de fluxo e proporção de acetoneitrila na fase móvel no ensaio de robustez

Parâmetros modificados	Níveis	$t_r^* \pm DPR\%$	Concentração (µg/mL)* $\pm DPR\%$
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,950	9,023 \pm 1,63	49,23 \pm 0,84
	1,000	8,993 \pm 0,84	49,03 \pm 1,26
	1,050	8,219 \pm 1,10	48,86 \pm 1,46
Acetoneitrila (%)	52	7,291 \pm 4,61	48,24 \pm 1,45
	54	9,730 \pm 3,50	49,7 \pm 0,42
	56	8,196 \pm 4,43	49,3 \pm 0,36

*n=3

Aplicabilidade do método

O método de extração aplicado foi adequado para um analito lipofílico, conforme os valores de recuperação do 4-NRC extraído da solução BSA demonstrados na Tabela 4. O valor de DPR% médio da recuperação entre os três níveis das concentrações avaliadas foi 17,54% atendendo as recomendações da ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 4. Dados de recuperação do 4-NRC adicionado à solução de proteína plasmática (BSA), após análise em CLAE-PDA

Concentração (µg mL ⁻¹)	Área do pico $\pm DPR\%*$	Recuperação (Média $\pm DPR\%$)
7,5	65329 \pm 1,39	73,4 \pm 3,0
10	104536 \pm 1,95	95,1 \pm 5,0
15	134984 \pm 0,85	69,2 \pm 2,0

* Média de, no mínimo, 03 extrações

DISCUSSÃO

Os testes de conformidade do sistema são utilizados para verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico são adequadas para o desenvolvimento do método analítico, por apresentarem valores dentro de limites aceitos e recomendados internacionalmente (Shabir, 2003; FDA, 1994). Devem ser realizados antes da validação do método para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de qualidade (Ribani et al., 2004).

O método instrumental de separação desenvolvido foi capaz de detectar exatamente o composto, pois nesta análise não se evidenciou a coeluição de interferentes com tempo de retenção equivalente ao 4-NRC (10,5 minutos), garantindo que a quantificação do analito de interesse

não seja afetada pela presença de impurezas, metabólitos, produtos de degradação ou compostos endógenos (Cassiano et al., 2009; Brasil, 2003). A análise de pureza do pico também é uma ferramenta útil no desenvolvimento de um método analítico, uma vez que permite a detecção de impurezas durante a sua padronização (Papadoyannis & Gika, 2005). Adicionalmente, os resultados da similaridade dos espectros UV em três pontos do pico cromatográfico (*upslope*, *downslope* e *top*) evidenciaram elevada pureza cromatográfica do pico de 4-NRC confirmando, assim, a seletividade do método.

Os critérios para aceitação da curva de calibração seguem guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais. Em geral, o modelo de calibração deve ser construído a partir da análise de 6 a 8 concentrações conhecidas do analito e o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98 (Kollipara et al., 2011; Cassiano et al., 2009; Brasil, 2003). Assim, a linearidade do método, testada por análise de regressão linear, bem como a significância estatística da curva ajustada, assegura que o método desenvolvido é linear, está ajustado na faixa de concentração estudada e possui forte relação entre os valores, visto que não há diferença estatística significativa entre os mesmos ($p < 0,001$) (Montgomery, 2000).

A precisão de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método bioanalítico é confiável ou não para o objetivo da análise. A exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais, aceitos como referência (Cassiano et al., 2009). Desta forma, o método analítico demonstrou precisão e exatidão através da concordância das concentrações medidas e nominais do analito na amostra adicionada.

A avaliação da robustez do método demonstrou que as pequenas alterações, passíveis de ocorrer na rotina laboratorial, não influenciaram nos resultados obtidos para seletividade, exatidão e precisão (Cassiano et al., 2009; Brito et al., 2003).

A recuperação (R) é definida como a razão percentual entre as quantidades de analito presente na amostra teste extraído relativamente à solução padrão, em solvente orgânico. De acordo com a RE 899/2003, não está estabelecido um valor mínimo para a recuperação em amostras biológicas. Recomenda-se que o teste apresente precisão (DPR%) de até 20% entre as replicatas de cada conjunto (Brasil, 2003).

A recuperação relativa experimental para compostos lipofílicos não representa a recuperação real do fármaco no meio, ou seja, uma real transferência de massa em condições de equilíbrio entre o fluido perfusante e o dialisado. Esta recuperação aparente é resultado da difusão do analito pela membrana, bem como da ligação à tubulação e a sonda, dificultando o uso de microdialise para este tipo de substância (Bettoni, 2009; Silva et al., 2006). Assim, a variação entre taxas de recuperação de 4-NRC entre 69,2 ± 2% e 95,1 ± 5,0% pode ser devido a maior dificuldade de solubilização da substância lipofílica em maior concentração, possível adsorção no material de análise, concentração mais próxima ao limite de quantificação,

dificultando a sensibilidade, precisão e reprodutibilidade da técnica. Porém, em métodos bioanalíticos é improvável que recuperações de pelo menos 50% comprometam a integridade e seletividade do método, podendo fornecer exatidão e precisão se a detecção adequada for alcançada e estiver em conformidade com o controle de qualidade (Causon, 1997; Bressolle et al., 1996).

Dentre algumas alternativas descritas na literatura, o emprego de albumina (Groth & Jorgensen, 1997; Muller et al., 1995; Carneheim & Stahle, 1991) no fluido de perfusão pode contribuir para aumentar a recuperação *in vitro* de uma substância extremamente lipofílica. Portanto, recuperações de 4-NRC com valores superiores a 69% (Tabela 4) em amostras de solução proteica de plasma podem possibilitar estudos futuros de microdialise cutânea utilizando substâncias naturais lipofílicas.

Em conclusão, o método desenvolvido para a quantificação do extrato purificado de 4-NRC em CLAE-PDA demonstrou atender aos requisitos da RE 899/2003 (Brasil, 2003) para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação. O procedimento de extração foi considerado simples, rápido, de baixo custo e com resultados satisfatórios para a recuperação de 4-NRC adicionado à BSA. Portanto, conclui-se que o método analítico validado é aplicável na determinação quantitativa de 4-NRC em amostras microdialisadas na faixa de 5,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, uma vez que se mostrou reprodutível e linear nessa faixa de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo suporte financeiro e à Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende pela valiosa contribuição ao trabalho e doação do 4-NRC.

ABSTRACT

Development and validation of analytical method to determine 4-nerolidylcatechol (4-NRC) in plasma protein solution used for cutaneous microdialysis studies

This paper reports the validation of an analytical method for the determination, in skin microdialysis samples, of 4-nerolidylcatechol (4-NRC), a natural substance extracted from *Piper (Pothomorphe) umbellata* (Piperaceae) with recognized antioxidant activity. The liquid chromatographic system (HPLC-PDA Shimadzu LC20AT, pump LC-20AT, injector with autosampler SIL-20A) was coupled to a C18 column (Phenomenex® Synergi Fusion 4 μm RP-80 Å, 150 x 4.6 mm), with acetonitrile:methanol:water (54:20:26, v:v:v) as the mobile phase, flowing at 1.0 mL min^{-1} , with detection by absorbance at 280 nm, injection volume 30 μL and running time 15 min. The method was linear for concentrations from 5.0 to 200.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r=0.9996$). Detection and quantitation limits were, respectively, 1.35 and 4.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, precision (RSD < 5.0%) and accuracy (99.0-112.0%) within values recommended by ANVISA. The robustness was tested by measuring the effect of

varying the flow-rate and the proportion of acetonitrile in the mobile phase. Microdialysis perfusion solution of albumin (BSA) spiked with 4-NRC and subjected to liquid-liquid extraction showed recovery from 69 to 95%. This method is applicable to the analysis of 4-NRC for the purpose of cutaneous microdialysis studies, in view of the acceptable validation parameters obtained.

Keywords: 4-nerolidylcatechol. Validation studies. Biological matrix.

REFERÊNCIAS

- Araújo BV, Silva CF, Haas SE, Dalla Costa T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(4-5):876-81.
- Baldoqui DC, Kato MJ, Marques MOM. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (PIPERACEAE). *Quim Nova.* 2009;32(5):1107-9.
- Barrios JG, Farias GDA, Roggia I, Peixoto SC, Pons FR, Bruschi M, Raffin RP, Alves MP. Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. *Quim Nova.* 2011;34(8):1464-7.
- Bettoni CC. Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por *tape stripping in vitro* em pele humana e suína [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
- Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996 Nov 8;686(1):3-10.
- Brito NM, de Amarante Junior OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pest Ecotoxicol Meio Amb.* 2003;13:129-46.
- Carneheim C, Stahle L. Microdialysis of lipophilic compounds: a methodological study. *Pharmacol Toxicol.* 1991;69(5):378-80.
- Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova.* 2009;32(4):1021-30.
- Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;689(1):175-80
- Collins CH, Braga GL, Bonato OS. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora Unicamp; 2006.
- Couto RO, Conceição EC, Chaul LT, Oliveira EMS, Alves SF, Rezende KR, Bara MTF, Paula JR. Validated CLAE-PDA Method for Rosmarinic Acid Quantification in Rosemary. *Lat Am J Pharm.* 2011;30(10):1951-6.
- Food and Drug Administration – FDA. Center for Drug Evaluation and Research - CDER. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods [Internet]. Silver Spring: Food and Drug Administration; 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>
- Groth L, Jorgensen A. *In vitro* microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. *Anal Chim Acta.* 1997;355(1):75-83.
- Gustafson KR, Cardellina II JH, McMahon JB, Pannel LK, Cragg GM, Boyd MR. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J Org Chem.* 1992;57(10):2809-11.
- Kollipara S, Bende G, Agarwal N, Varshney B, Paliwal J. International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario. *Chromatographia.* 2011;73(3-4):201-17.
- Lambert WE, Bocxlaer JF, De Leenheer AP. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;689(1):45-53.
- Lanças FM. Cromatografia Líquida Moderna – HPLC/CLAE. Campinas: Editora Átomo; 2009.
- Montgomery DC. Experiments with a Single Factor: The Analysis of Variance. In: Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. New York: John Wiley & Sons; 2009. p. 60-100.
- Muller M, Rohde B, Kovar A, Georgopoulos A, Eichler HG, Derendorf H. Relationship between serum and free interstitial concentrations of cefodizime and cefpirome in muscle and subcutaneous adipose tissue of healthy volunteers measured by microdialysis. *J Clin Pharmacol.* 1997;37(12):1108-13.
- Muller M, Schmid R, Wagner O, Osten BV, Shayganfar H, Eichler HG. *In vivo* characterization of transdermal transport by microdialysis. *J Controlled Release.* 1995;37(1-2):49-57.
- Noriega P, Ropke CD, Consiglieri VO, Taqueda MES, Tavares LC, Wasicky A, Bacchi EM, Barros SBM. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. *Int J Pharm.* 2008;353(1-2):149-59. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.039.
- Papadoyannis IN, Gika, HG. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. *J Liquid Chromatogr Relat Technol.* 2005;27(6):1083-92.

- Plock N, Kloft C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci.* 2005;25(1):1-24.
- Rezende KR, Barros SBM. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by CLAE-UV. *Braz J Pharm Sci.* 2004;40(3):373-80.
- Ribani M, Bottoli, CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova.* 2004;27(5):771-80.
- Ribeiro FAL, Ferreira MMC, Morano SC, da Silva R, Schneider RP. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim Nova.* 2008;31(1):164-71.
- Rittenhouse KD, Peiffer RL, Pollack GM. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for *in vivo* models of ocular absorption and disposition. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(6):951-9.
- Rodrigues MVN, Rehder VLG, Sartoratto A, Júnior SB, Santos AS. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *MultiCiência.* 2006;7:1-14.
- Ropke CD, Ostrosky EA, Kaneko TM, Camilo CM, Sawada TCH, Barros SBM. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. *Braz J Pharm Sci.* 2003;39(2):209-217.
- Ropke CD, Sawada TCH, da Silva VV, Michalany NS, Barros SBM. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(3):272-6.
- Schuck VJA, Rinas I, Derendorf H. *In vitro* microdialysis sampling of docetaxel. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(4):807-13
- Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A.* 2003;14;987(1-2):57-66.
- Silva FFS, Cunha LC, Rezende KR. Métodos de avaliação da fração de fármaco ligado (% B) a proteínas de fluidos biológicos. *Rev Eletr Farm.* 2006;3(2):99-108.
- Silva JA, Bedor DCG, Sousa CEM, Santana DP, Egito EST. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2010;31(1):41-6.
- Silva VV, Ropke CD, Almeida RL, Miranda DV, Kera CZ, Rivelli DP, Sawada TCH, Barros SBM. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. *Int J Pharm.* 2005;303(1-2):125-31.
- Soares LA. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de *pothomorphe umbellata* (Piperaceae) em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina [Dissertação]. Goiânia: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás; 2007.
- Valadares MC, Rezende KR, Pereira ERT, Sousa MC, Gonçalves B, de Assis JC, Kato MJ. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(10):1975-8.
- Wang Y, Wong SL, Sawchuk RJ. Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus. *Pharm Res.* 1993;10(10):1411-19.
- Whitaker G, Lunte CE. Investigation of microdialysis sampling calibration approaches for lipophilic analytes: doxorubicin. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):490-6. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.05.023.

Recebido em 10 de outubro de 2012

Aceito para publicação em 11 de dezembro de 2012