

## **Validação do método de quantificação de midazolam em matriz biológica para determinação de capacidade inibitória do protótipo LQFM018 sob enzimas CYP3A**

**Jéssica Martins Moreira<sup>1</sup>(IC)\*, Caroline Rego Rodrigues<sup>1</sup>(PQ).**

1 Universidade Estadual de Goiás. Campus Ceres. Rua Lucas Marcelino dos Santos Qd. 34 Lt. 3. Bairro: Setor Curumim, CEP: 76300-000, Ceres – GO, Brasil.

\* jessicamartins.m@hotmail.com

O protótipo de fármaco antineoplásico LQFM018 foi sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal e foi selecionado para passar por testes pré-clínicos farmacocinéticos e avaliação de possível interação medicamentosa com medicamentos. Como a subfamília de enzimas hepáticas CYP3A é responsável pela biotransformação de pelo menos 50 % dos fármacos conhecidos, esta foi selecionada para os testes de inibição enzimática com o protótipo em questão. O objetivo deste trabalho foi validar um método de quantificação de midazolam por HPLC UV-VIS para avaliar a quantidade de midazolam metabolizada por enzimas hepáticas CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar na presença e ausência da substância teste LQFM018. Método: HPLC Shimadzu® Autosampler com bomba quaternária. Coluna: C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm Shim-pack, Shimadzu®. Detecção em 230 nm. Fase móvel: acetonitrila, metanol e água ultrapurificada (20:40:40 v/v), sob o fluxo de 1,0 mL/min. Volume de injeção 20 µL. O método testado demonstrou ser seletivo/específico, limites de detecção e quantificação de 50 e 200 ng/mL, respectivamente. O método não demonstrou efeito residual ou efeito matriz. O coeficiente de correlação linear para a faixa testada esteve acima de 0,99. O método demonstrou ser útil para quantificação de midazolam extraído da matriz biológica testada.

Palavras-chave: Citocromo P450. Inibição enzimática. Midazolam. Cetoconazol. HPLC.

### **Introdução**

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos é uma ferramenta essencial para a quantificação de fármacos. Os testes de especificidade/seletividade, precisão, exatidão, linearidade, robustez, estabilidade e efeito matriz demonstram a confiabilidade do método desenvolvido e permitem que se avalie o comportamento do ativo em matrizes biológicas (BRASIL, 2012).

Em 2004, Vassilev e colaboradores identificaram, por meio de análises em bibliotecas de produtos químicos sintéticos, um grupo de moléculas que possuíam

atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, denominando-as nutlins. No ano de 2011, foi desenvolvida uma linha de pesquisa no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) com o intuito de obter compostos com o mesmo mecanismo de ação dos nutlins na qual, através da simplificação molecular, conseguiu-se elaborar o desenho, a síntese e a avaliação do perfil antineoplásico de novos candidatos a protótipos de fármaco, obtidos a partir do protótipo nutlin-3 (CARVALHO, 2011).

O LQFM018, ainda está na fase de testes, mas já apresentou resultados preliminares positivos quanto à citotoxicidade em células malignas (dados ainda não publicados). Considerando estes resultados iniciais, que revelaram a ação farmacológica do protótipo LQFM018 para perfil de atividade antineoplásica aliados aos estudos cinéticos em ratos e camundongos em realização pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico Farmacológicas (NEPET) da UFG, entende-se que é necessário continuar estes estudos no sentido de analisar também a possível interferência do LQFM018 no metabolismo de outras drogas.

Uma forma de avaliar se a droga em questão poderá apresentar interação farmacológica com outros fármacos ocorre por meio de experimentos *in vitro* em que as enzimas são colocadas na presença e ausência da droga teste enquanto metabolizam o fármaco modelo de cada subfamília. Para a subfamília CYP3A, o fármaco modelo é o midazolam. Este fármaco é usado como substrato para avaliar a atividade de CYP3A ao ser metabolizado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV-VIS (HPLC-PDA) (LI et al., 2010).

Ensaio para avaliar o perfil farmacocinético de uma substância são conduzidos para obter informações adequadas sobre sua biotransformação de forma a auxiliar no conhecimento do comportamento da substância no organismo. Métodos por HPLC são considerados padrão ouro na quantificação de substâncias para a condução adequada destes testes.

O objetivo deste trabalho foi validar um método de quantificação de midazolam por HPLC UV-VIS para avaliar a quantidade de midazolam metabolizada por enzimas hepáticas CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar na presença e ausência da substância teste LQFM018.



## Material e Métodos

Os reagentes, equipamentos e outros materiais foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Luiz Carlos da Cunha assim como os padrões de midazolam, 1-hydroxymidazolam e 4-hydroxymidazolam (Sigma®). Para as análises cromatográficas foram usados equipamentos devidamente qualificados e reagentes grau HPLC.

O protótipo LQFM18 foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Ricardo Menegatti - Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás – LQFM. Os padrões internos (PI) a serem empregados na monitoração da extração dos analitos, foram adquiridos de fornecedores do mercado. Os materiais de consumo grau cromatográfico foram adquiridos no mercado nacional.

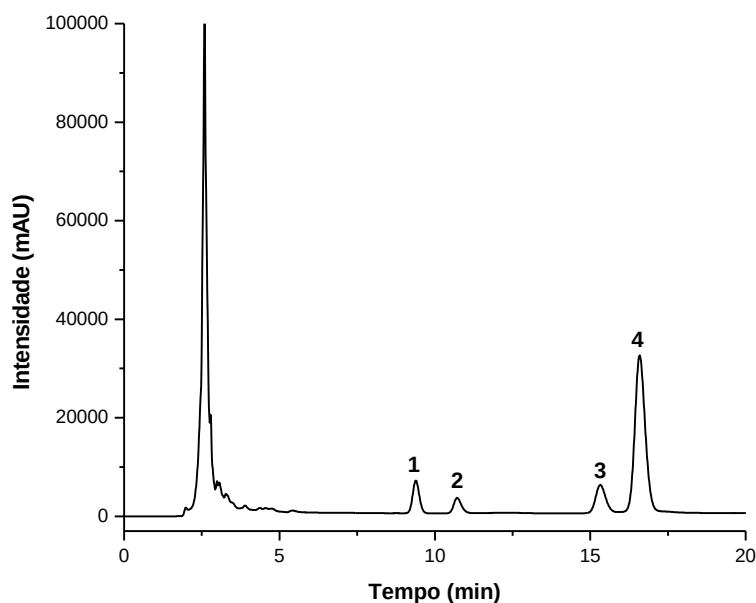
As análises qualitativas e quantitativas do substrato midazolam e seus metabólitos em fluidos biológicos de animais - lisado produzido por Costa e Rodrigues (2017) foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® Autosampler com bomba quaternária. A coluna utilizada foi C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm Shim-pack, Shimadzu®. Detecção em 230 nm. Fase móvel: acetonitrila, metanol e água ultrapurificada (20:40:40 v/v), sob o fluxo de 1,0 mL/min. Volume de injeção 20 µL.

A validação da metodologia analítica para o midazolam foi baseada em estudo de Oliveira et al. (2015) que se baseou em Li et al. (2010). Os parâmetros de validação da técnica analítica foram baseados na RDC 27 (BRASIL, 2012).

## Resultados e Discussão

O método testado demonstrou ser seletivo/específico, sendo que no comprimento de onda testado não houve interferência de outras substâncias (LQFM018, cetoconazol, diazepam ou metabólitos) no tempo de retenção do analito (midazolam) como pode ser observado na Figura 1. Limites de detecção e quantificação foram de 50 e 200 ng/mL, respectivamente. O método não demonstrou efeito residual ou efeito matriz. O coeficiente de correlação linear para a faixa testada (200 a 800 ng/mL) esteve acima de 0,99.

Figura 1. Cromatograma do teste de metabolização do lisado hepático extraído de ratos Wistar. 4-hidroxiimidazolam (1), 1-hidroxiimidazolam (2), midazolam (3) e diazepam (4).



Dessa forma, este método foi útil para a quantificação de midazolam extraído de meio biológico contendo enzimas microssomais e permitiu a avaliação do papel do LQFM018 como inibidor de enzimas CYP3A. Porém, o método avaliado pode ser usado também na avaliação de inibição de CYP3A por outras substâncias, desde que estas não interfiram na detecção do analito (BRASIL, 2012).

### Considerações Finais

O método avaliado atendeu aos principais testes de validação preconizados pela Anvisa e pode ser usado para avaliar a metabolização de midazolam pela subfamília CYP3A.

### Agradecimentos

Agradecemos ao NEPET – Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.

## Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada RDC nº 27, de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, maio 2012.

CARVALHO, F. S. Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais. Goiânia, 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, 95p.

COSTA, H. R. F.; RODRIGUES, C. R. Produção de lisado hepático de ratos Wistar para análise de capacidade de metabolização de CYP3A. In: **Anais do IV CEPE – Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**. Pirenópolis: 2017 (No prelo).

LI, W.; XIN, H.; SU, M.; XIONG, L. Inhibitory effects of Schisandrin A and Schisandrin B on CYP3A activity. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**. v. 32, p. 1-7, 2010.

OLIVEIRA, S. R.; OLIVEIRA NETO J. R.; SILVA, M. A. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, D. F. A.; CARDOSO, E. C.; CUNHA, L. C. Evaluation of inhibitory effects of some brazilian cerrado plant extracts on CYP3A in vitro activity. **International Journal of Phytopharmacology**. v. 6, n. 1, p. 47–56, 2015.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARNAVAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**. v. 303, n. 5659, p. 844-848, 2004.