

GIOVANNI CARVALHO GUZZO

**ESTUDO DO METABOLISMO, QUÍMICA E FARMACOCINÉTICA DO
PRINCIPAL METABÓLITO DA DIIDROERGOCRISTINA**

CAMPINAS

Unicamp

2009

GIOVANNI CARVALHO GUZZO

**ESTUDO DO METABOLISMO, QUÍMICA E FARMACOCINÉTICA DO
PRINCIPAL METABÓLITO DA DIIDROERGOCRISTINA**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, da Universidade de Campinas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Fisiopatologia Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DENUCCI

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G989e Guzzo, Giovanni Carvalho
Estudo do metabolismo, química e farmacocinética do principal
metabólito da Diidroergocristina / Giovanni Carvalho Guzzo.
Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Gilberto De Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Diidroergocristina. 2. Farmacocinética. 3. Espectrometria
de massa. 4. Metabolismo. I. De Nucci, Gilberto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Metabolic, chemical and pharmacokinetics study of the
main Diidroergocristine metabolite**

Keywords: • Diidroergocristine
• Pharmacokinetics
• Mass spectrometry
• Metabolism

**Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental**

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Gilberto De Nucci
Prof. Dr. Jayme Antunes Maciel Júnior
Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
Prof. Dr. Wellington Ribeiro**

Data da defesa: 28-09-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Giovanni Carvalho Guzzo

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Wellington Ribeiro
2. Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
3. Prof. Dr. Carlos Alberto Mantovani Guerreiro
4. Prof. Dr. Jayme Antunes Maciel Junior
5. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/09/2009

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Misericórdia Divina, que sempre nos renova as oportunidades para a conquista de novos méritos.

Agradecimentos sinceros ao meu orientador **Dr. Gilberto DeNucci**, pelo exemplo de profissionalismo e inteligência, bem como minha gratidão pela aceitação na orientação deste trabalho.

A amiga **Beatriz Bicalho** pela ajuda na condução e orientação na prática de pesquisa e todos os ensinamentos diários por ela passados.

A minha esposa **Renata** e minha filha **Zara** pelo apoio, paciência e muito amor que deram-me forças para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho a meus pais, **Mário** e **Marília**, pelo suporte e exemplo de vida que me guiaram na conquista deste mérito.

Aos meus irmãos, **Mário Jr.** e **Alessandra**, pela amizade e força nesta caminhada.

A minha tia e madrinha **Vera Carvalho** pela força, amor e ajuda na confecção da versão final desta tese.

Aos amigos, **André, Demétrius, Juan, Juliana, Marinalva, Rita e Malu** pelo incentivo, apoio e imensurável amizade durante nossa convivência no laboratório.

À toda equipe da **Galeno Research Unit** pelo acolhimento durante a realização do projeto.

Aos amigos **Dr. Cláudio Ortega** e **Carlos Zaccarelli** pela força incontestável que ajudaram nesta conquista.

SUMÁRIO

	PGs.
RESUMO.....	<i>xv</i>
ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	23
2- OBJETIVOS.....	65
3- ARTIGO.....	69
4- DISCUSSÃO.....	83
5- CONCLUSÃO.....	95
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
7- ANEXOS.....	111

LISTA DE ABREVEATURAS

5-HT	Serotonina
Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AE	Alcalóide do Ergot
API	Ionização Atmosférica por Pressão
ASC_{0-∞}	Área Sobrea a Curva do tempo 0 ao infinito
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C_{máx}	Concentração máxima
CV	Coeficiente de Variação
CYP450	Citocromo P-450
DHEC	Diidroergocristina
DPR	Desvio-padrão Relativo
EI	Impacto de Elétrons
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Foods and Drugs Administration</i>
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IES	Ionização por <i>Eletrospray</i>
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS/MS	Cromatografia acoplada a espectrometria de massa
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
MS	Espectrometria de Massa
MRM	Monitoramento de Reação Múltipla
RIA	Radioimunoensaio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S12	Fração pré-microsomal
SNC	Sistema Nervoso Central
t_{max}	Tempo máximo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do alcalóide do ergot e seus derivados.....	pg. 29
Figura 2	Estrutura química da Diidroergocristina.....	pg. 35
Figura 3	Esquema de funcionamento do HPLC.....	pg. 39
Figura 4	Visualização de exemplo de espectro em espectrometria de massa.....	pg. 41
Figura 5	Esquema de funcionamento do sistema de <i>eletrospray</i>	pg. 44
Figura 6	Desenho esquemático de introdução da amostra em um espectrômetro de massa por um sistema de <i>eletrospray</i>	pg. 45
Figura 7	Moléculas da Ergotamina, seu metabólito (8'-hidroergotamina) e Caroverina e o ponto de quebra (seta) para a formação de íons menores e mais estáveis.....	pg. 46
Figura 8	Resolução de espectro na definição de massa do íon da Dihidroergotamina e íons adjacentes.....	pg. 47
Figura 9	Esquema de funcionamento do método Quadropolo em espectrometria de massa.....	pg. 49
Figura 10	Sistema de Espectrometria de Massa Quadropolo Simples.....	pg. 51
Figura 11	Sistema de Espectrometria de Massa em Seqüência.....	pg. 53

RESUMO

Diidroergocristina (DHEC) é um fármaco semi-sintético, derivada do alcalóide do Ergot, principalmente utilizada para enxaqueca e estudada em distúrbios cognitivos relacionados ao envelhecimento. No presente estudo, o seu principal metabólito 8-hidroxi-diidroergocristina (8'-OH-DHEC) foi produzido através de incubação de preparações enzimáticas de fígado de boi usando o Mesilato de Diidroergocristina como substrato. Foi feita uma avaliação de qual o melhor método de preparação enzimática a ser utilizado para produção do padrão do metabólito ativo em grande escala através da comparação de atividade enzimática entre microssomos e S12, ambos extraídos de hepatócitos de fígado bovino. A purificação desse metabólito foi feita através da utilização de uma coluna cromatográfica clássica com sílica gel e cromatografia líquida de fase reversa. Sua identificação foi baseada em mensuração de sua massa molecular por espectro de fragmentação de massa e Ressonância Magnética (NMR – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$). Através da produção dessa substância *in vitro*, um método rápido, sensível e robusto de determinação da DHEC e seu principal metabólito foi desenvolvido e validado em LC-MS/MS a partir de análise de plasma humano. Bromocriptina foi utilizado com padrão interno e os limites de quantificação da DHEC e 8-OH-DHEC foram 10 pg/ml e 20 pg/ml, respectivamente. Os parâmetros farmacocinéticos foram investigados em 12 voluntários masculinos através da administração de uma dose única oral de 18mg de DHEC, via oral (Ikevert®). O C_{max} de DHEC observado foi $0,28 \pm 0,22 \mu\text{g/l}$; o T_{max} $0,46 \pm 0,26\text{h}$; a ASC $0,39 \pm 0,41 \mu\text{g/l.h}$; com meia-vida de $3,50 \pm 2,27\text{h}$. O pico de concentração do 8-OH-DHEC foi $5,63 \pm 3,34 \mu\text{g/l}$; com T_{max} de $1,04 \pm 0,66\text{h}$; e ASC de $13,36 \pm 5,82 \mu\text{g/l.h}$; observando uma meia-vida de $3,90 \pm 1,07\text{h}$. A administração de 18mg de DHEC foi bem tolerada, sem associação com qualquer reação adversa. Os resultados farmacocinéticos obtidos foram comparados com dados anteriores obtidos para a DHEC por meio de radioimunoensaio (RIA). Uma diferença nos parâmetros farmacocinéticos de C_{max} e ASC é observada entre os métodos analíticos e sua possível relação na prática clínica é discutida.

Palavras-chave: Diidroergocristina, 8'-Hidroxi-diidroergocristina, Farmacocinética, Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Dihydroergocristine (DHEC) is a semi-synthetic drug mainly used for migraine and studied in age-related cognitive impairment. In this study, its major metabolite 8'-hydroxy-dihydroergocristine (8'-OH-DHEC) was produced in incubates of a bovine liver preparation using dihydroergocristine mesylate (DHECM) as substrate. An evaluation of the best enzymatic preparation method was done in order to verify the adequate process for massive production of the metabolite. A comparison between microsomes and S12 was performed, where both preparations were extracted from bovine hepatocytes. Purification was achieved by flash silica gel column and reverse phase liquid chromatographies, and identification was based on accurate molecular mass measurements, mass fragmentation spectra and NMR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) chemical shifts. By using the substance produced in vitro, a fast, sensitive, specific and robust LC/MS/MS method for the simultaneous determination of DHEC and its major metabolite in human plasma was developed and validated. Bromocriptine was used as internal standard and limits of quantification for DHEC and 8'-OH-DHEC were 10 pg/ml and 20 pg/ml, respectively. Pharmacokinetic parameters were investigated on 12 male healthy volunteers to whom a single dose of 18 mg DHECM was administered in tablets (Iskevert®). The peak of DHEC was 0.28 ± 0.22 $\mu\text{g/l}$, the t_{max} 0.46 ± 0.26 h, the AUC_{last} 0.39 ± 0.41 $\mu\text{g/l.h}$ and the terminal elimination half-life 3.50 ± 2.27 h. The peak of 8'-OH-DHEC was 5.63 ± 3.34 $\mu\text{g/l}$, the t_{max} 1.04 ± 0.66 h, the AUC_{last} 13.36 ± 5.82 $\mu\text{g/l.h}$ and the terminal elimination half-life 3.90 ± 1.07 h. Dosing of 18 mg DHECM was well tolerated, causing no adverse events. The pharmacokinetics parameters observed on this study were compared to those obtained in DHEC analysis by radioimmunoassay (RIA). A difference in C_{max} and AUC is observed between both methods and its clinical implications are discussed.

Key-words: Dihydroergocristine, 8'-Hydroxydihydroergocristine, Pharmacokinetics, Mass Spectrometry.

1-INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE METABOLIZAÇÃO *IN VITRO*

O caminho para o desenvolvimento de novas drogas passa por vários estudos pré-clínicos que têm como objetivo estabelecer a real potencialidade da substância teste. Estes estudos incluem, principalmente, testes de mutagenicidade do DNA e de metabolismo, uma vez que a biotransformação poder afetar a segurança e a eficácia da droga por formação de metabólitos terapeuticamente ativos ou tóxicos.

Vários modelos pré-clínicos têm sido utilizados para estudo de metabolismo. Dentre eles destacam-se as preparações microsossomais de fígado por serem mais fáceis de trabalhar do que animais inteiros. Microsossomas são fragmentos das estruturas tubulares e cisternas do retículo endoplasmático, delimitados por membranas que podem ou não apresentar ribossomos associados (Carvalho, 2001, Swanson, 1988). Os preparados microsossomais de fígado são largamente utilizados para caracterizar o papel do citocromo P-450 e outras enzimas no metabolismo de xenobióticos.

1.1.1 CONSTITUIÇÃO DO MICROSSOMA

Para possibilitar a separação dos componentes celulares, é necessário promover o rompimento da célula. Para tanto as células podem ser submetidas a choque osmótico, vibração ultra-sônica, forçadas a atravessar pequenos orifícios ou maceradas. Estes procedimentos promovem a quebra de muitas membranas celulares, dentre elas, a membrana plasmática e do retículo endoplasmático, em fragmentos que unidos formam vesículas fechadas. Com a escolha de um meio de homogeneização adequado, as diversas partículas, inclusive as vesículas derivadas do retículo endoplasmático (microsossomas), mantêm a maior parte das propriedades bioquímicas originais (Alberts, 2004).

Os microsossomas constituem 15 a 20% da massa total de uma célula hepática e contêm 50 a 60% do total de RNA da célula. Contêm também muitas enzimas que são utilizadas na síntese de triglicerídios, fosfolipídios e colesterol. Nos microsossomas existem dois sistemas de transportes de elétrons que contêm duas flavoproteínas (NADH-citocromo C-redutase e NADH-citocromo b5-redutase) e duas hemoproteínas

(citocromos b5 e P-450). O citocromo P-450 atua como oxidase terminal, e nas células hepáticas é utilizado para destoxificar ou inativar muitas substâncias. Estas enzimas oxidativas estão distribuídas principalmente na face externa ou citoplasmática da membrana do microsoma (Robertis, 1993).

Dentre os métodos utilizados para fracionamento celular e obtenção de microsoma, tem-se a centrifugação diferencial baseada na velocidade de sedimentação das estruturas celulares devido às diferenças de massa, superfície e densidade (Holtzman, 1985, Robertis, 1993; Carvalho, 2001). Este procedimento é realizado num equipamento conhecido por ultracentrífuga (Alberts, 2004), no qual a amostra contida em um tubo é inserida em um anel cilíndrico num rotor de metal. A rotação rápida do rotor promove uma força centrífuga que faz com que as partículas que estão presentes na amostra, se sedimentem. O vácuo possibilita a redução da fricção, evitando o aquecimento do rotor e garantindo que o sistema de refrigeração mantenha a amostra a 4°C. (Alberts, 2004).

Assim, de acordo com o procedimento utilizado, é possível também obter uma fração pré-microsomal, denominada S12. Essa, nada mais é do que uma mistura de fragmentos celulares (núcleo, lisossoma, peroxissoma e mitocôndria).

Portanto, os microsomas de fígado são bastante utilizados para caracterizar o papel do citocromo P-450 e outras enzimas no metabolismo de drogas presentes nos hepatócitos de humanos, os quais, quando utilizados em cultura de células, refletem o metabolismo de Fase I e II; captação e excreção do composto pela membrana plasmática. Há, entretanto, diferentes variações associadas ao processo de preparação do microsoma de fígado. Essas variações incluem as soluções de homogeneização, o número de rotações usadas para homogeneizar a amostra, a força com que a amostra é centrifugada e a inclusão ou não de sacarose na solução de homogeneização (Nelson, 2000).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE ALCALÓIDES DO ERGOT

1.2.1 HISTÓRICO

Desde o começo da história, o homem sempre se voltou à natureza para a descoberta de novos medicamentos. Microorganismos, como os fungos, têm demonstrado ser uma grande fonte de moléculas com ação medicinal (Maldom, 2002).

Dentro dessa classe, a espécie de fungo *Claviceps purpurea* tem sido alvo de grandes estudos farmacêuticos. Sendo mencionado pela primeira vez por volta de 600 a.C. como uma pústula nociva na orelha (alça) do grão de trigo ou de centeio que produzia um ergot típico. Em registros israelenses antigos foi registrado como “gramas nocivas que causam a queda do útero de mulheres grávidas e as fazem morrer no parto”, ficou conhecido por volta de 98-55 a.C. como possível causador do Ergotismo (Van Dongen, 1995).

A palavra ergot é derivada do termo *argot*, que provém de um dialeto francês arcaico, e significa “esporão de galo”. O Ergotismo foi uma epidemia muito conhecida na Idade Média, sendo também chamada de *Holy Fire* (Fogo Sagrado), pelo fato de provocar sensações de queimadura nas pessoas que ingeriam alimentos contaminados pelo fungo. Isto se explica por causa das gangrenas causadas pelo ergot, principalmente nos membros inferiores, por distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC) como excitação maníaca, convulsão e catalepsia; podendo causar a morte (Van Dongen, 1995)

Apesar de todo o conhecimento sobre o ergot, seu primeiro uso na medicina foi, provavelmente, como uma droga oxitócica. Em 1582, na Alemanha, Adam Loncier descreveu pela primeira vez a contração uterina pela administração do ergot. Porém, somente em 1809, John Steams publicou o uso do ergot na prática médica no *Medical Repository*, como “um medicamento que acelera o nascimento” (Eadie, 2004).

No ano de 1822, a indicação do ergot para aceleração do parto foi contestada por Hosack, em Nova York. Pesquisador da época, este médico percebeu que rupturas

uterinas estavam ocorrendo, levando a morte materna, fato este que levou ao abandono do uso do ergot no século XIX (Maldom, 2002).

Somente no final do século XIX e começo do século XX que o ergot foi considerado útil para a clínica médica, onde estudos envolvendo a droga na forma de alcalóides foram associados com o tratamento de enxaqueca (Eadie, 2004)

1.2.2 PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS ALCALÓIDES DO ERGOT

Muitos alcalóides que contêm um grupo metil ou hidroxil na posição 8 estão presentes em pequenas quantidades do ergot. Estes foram chamados *alcalóides da clavina* e consistem principalmente em 9-ergolenos (*p.ex., lisergol*) e 8-ergolenos (*p.ex., elimoclavina*, o isômero 8 ergoleno dolisergol).

As estruturas químicas dos alcalóides do ergot foram elucidadas principalmente por Stoll, por Jacobs, Craig e seus colaboradores (Rutschmann e Stadler, 1978). O isomerismo óptico deve-se à presença de dois átomos de carbono assimétricos (posições 5 e 8) na porção de ácido lisérgico da molécula. Os derivados do ácido *l*-lisérgico (o epímero na posição 5) e do ácido *d*-lisérgico (o epímero na posição 8) apresentam atividade biológica relativamente pequena. Estes últimos derivados incluem a *ergotamina*, que constitui 40% das preparações clínicas de tartarato de ergotamina como resultado da epimerização espontânea. A hidrólise da ergonovina e seus derivados resultam em ácido lisérgico e em uma amina; por isso, eles são chamados de *alcalóides aminados*. Os alcalóides de maior peso molecular fornecem ácido lisérgico, amônia, ácido pirúvico (ou um derivado deste), prolina e outro aminoácido (fenilalanina, leucina, isoleucina ou valina) e são conhecidos como *alcalóides aminoacídicos* ou *ergopeptinas* (Goodman, 2007).

Foram preparados inúmeros derivados semi-sintéticos dos alcalóides do ergot e vários são de interesse terapêutico. Em 1943, Stoll e Hofmann demonstraram que uma dupla ligação reduzível do ácido lisérgico uma nova série de compostos foram produzidos. Estes foram chamados *diidroergotamina*, *diidroergocristina* (DHEC),

diidroergocronina e *diidroergocriptina*, possuindo propriedades farmacológicas diferentes daquelas dos alcalóides que lhe deram origem (Freis, 1949).

Outro derivado da ergopeptina é a *bromocriptina*. Além disso, é possível preparar diferentes amidas do ácido lisérgico. Dois outros produtos desta série, a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a hidroxibutilamina do ácido lisérgico (metilergonovina) são de interesse farmacológico. A metilação do nitrogênio do indol do último composto fornece 1-metilmetilergonovina (*metisergida*). Também foram preparados inúmeros compostos afins que não são derivados do ácido lisérgico, entre eles, existem a *lisurida*, a *lergotrila* e a *metergolina* (Figura 1).

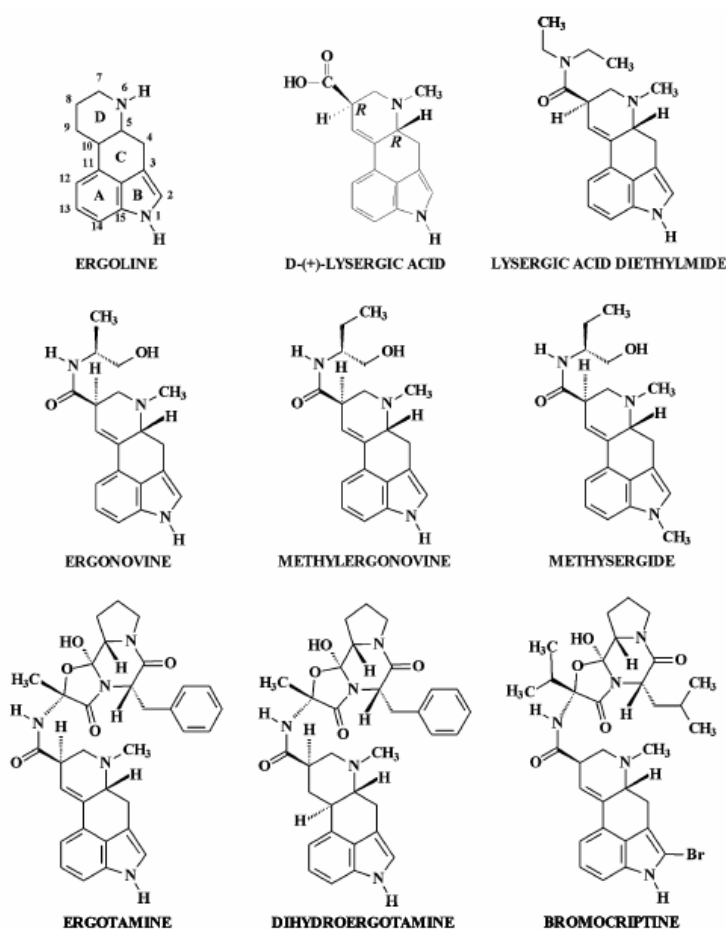


Figura 1 – Estrutura química do alcalóide do ergot e seus derivados (Schiff, 2006).

1.2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES DO ERGOT

Em geral, os efeitos dos AE parecem ser resultantes de sua ação como agonistas parciais ou antagonistas em receptores adrenérgico, dopaminérgicos e triptaminérgicos. A diferença do efeito dos AE depende do agente, dosagem, espécie em que é utilizado, tecido e se em condições fisiológicas ou experimentais.

Porém, algumas ações dos AE não são compatíveis com as propriedades descritas acima. Por exemplo (Maldom, 2002):

- a) enquanto os efeitos agonistas são aparentemente apenas em concentrações menores do que as necessárias para se observar o antagonismo, este fato nem sempre acontece (e.g., a ação da metilsegrida em vasos cerebrais);
- b) os efeitos de agonistas totais (como a norepinefrina) são, geralmente, antagonizados por concentrações baixas de AE, mesmo por aqueles que possuem uma fraca ação de agonistas parciais (e.g., ação da ergonovina em arteríolas);
- c) a resposta contrátil a outros agentes, como acetilcolina (Ach) e angiotensina, são, algumas vezes, também antagonizadas por agentes adrenérgicos ou triptaminérgico.

Essas e outras observações dão ênfase à importância do conhecimento do estado fisiológico ou patológico na determinação do espectro e intensidade dos efeitos produzidos em animais ou em pacientes (Maldom, 2002).

Junto as considerações estereoquímicas mencionadas acima, algumas regras sobre a relação estrutura-atividade têm sido investigadas nos últimos anos. Em geral, um amido pequeno derivado do ácido lisérgico é um antagonista potente e seletivo da serotonina (5-HT), enquanto os alcalóides aminoácidos são, geralmente, menos seletivos e mostram afinidades em antagonizar agentes α -adrenérgicos e triptaminérgicos. Derivados diidrogenados têm menor intensidade agonista do que os alcalóides que lhes deram origem. Finalmente, a inserção de um grupo metil na posição 1 resulta na redução da afinidade em receptores de catecolaminas e maior habilidade e seletividade em bloquear receptores triptaminérgicos (Maldom, 2002).

1.2.3.1 Efeito dos Alcalóides do Ergot no Útero

Todos os AE naturais aumentam substancialmente a atividade motora do útero. Após pequenas doses, a força e a frequência das contrações aumenta, ou ambas, porém é seguido de um relaxamento gradativo e normal. Com o aumento das doses, se observa uma contração mais forte e prolongada e aumento do tônus muscular, que pode resultar em uma contração constante. Apesar de que essas características apontem para o seu uso na facilitação do trabalho de parto, sua indicação no período pós-parto também pode ser relevante, bem como em situações de aborto, no intuito de controlar o sangramento e manter a contração uterina. O útero grávido é muito sensível e pequenas doses de AE podem ser administradas logo após o parto para se obter o máximo de resposta, geralmente sem efeitos colaterais (Maldom, 2002).

Embora todos os AE naturais tenham qualitativamente o mesmo efeito no útero, ergonovina é mais ativo e menos tóxico que a ergotamina. Por esses motivos, ergonovina e seu derivado semi-sintético, metilergonovina, tem substituído o uso de outros AE como estimulantes da contração uterina na obstetrícia. Experimentos em animais demonstraram que os alcalóides diidrogenados não possuem as mesmas propriedades de contração uterina do que os alcalóides que foram originados (Maldom, 2002).

1.2.3.2 Efeito dos Alcalóides do Ergot no Sistema Cardiovascular

Os alcalóides aminoácidos naturais, particularmente a ergotamina, promovem a contração de veias e artérias. Enquanto a diidroergotamina possui uma atividade vasoconstritora relevante, sua ação mais eficaz envolve o aumento da capacitância e não na resistência dos vasos (Tfelt-Hansen, 2008).

Derivados diidrogenados do grupo da ergotamina são consideravelmente menos ativos e produzem o efeito de hipotensão por atuar no Sistema Nervoso Central (CNS). Nas doses usadas no tratamento de enxaqueca, a administração retal de ergotamina

produz uma pequena mudança na pressão arterial e, também, leva a um aumento progressivo na resistência vascular periférica, que pode persistir até 24h (Maldom, 2002).

Estudos demonstraram que a diidroergotamina tem pouca ação na constrição de artérias humanas e que a administração endovenosa deste alcalóide, e também da ergotamina, em altas doses, leva um aumento rápido da pressão arterial que se dissipa em poucas horas. Em ratos, esse efeito foi atribuído a ação estimulante no receptores α_2 -adrenérgicos presente nas arteríolas (de Hoon, 2001).

Com exceção do cérebro, o aumento na resistência vascular é acompanhado pela redução do fluxo sanguíneo em vários órgãos. Este efeito também é observado em outros alcalóides aminos quando administrados em doses terapêuticas, porém com menos intensidade quando comparado com a ergotamina. Contudo, é importante ressaltar o fato de que, AE que produzem vasoconstrição periférica também podem causar danos nos capilares do endotélio. Outros efeitos adversos podem ser observados no uso de AE, como estase vascular, trombose e gangrena (que pode estar relacionada com a atividade vasoconstritora) (Silberstein, 2003).

1.2.3.3 Uso de Alcalóides do Ergot no Tratamento de Enxaqueca

Derivados do ergot tiveram sua primeira aparição como armas terapêuticas contra a enxaqueca por volta da década de 20, porém, hoje, pode-se dizer que são uma das principais classes de agentes farmacológicos para o alívio rápido de casos severos ou moderados dessa patologia (Tfelt-Hansen, 2008).

Alcalóides do ergot são agentes farmacológicos não seletivos que interagem com inúmeros receptores, incluindo os receptores de serotonina 5-HT₁ e 5-HT₂, bem como os adrenérgicos e dopaminérgicos. Pelo fato da diidroergotamina ser um antagonista competitivo de uma variedade de subpopulações de receptores, essa droga tem uma potente ação nos receptores 5-HT₁, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, D2 dopaminérgico, α_1 -adrenérgico e α_2 -adrenérgico. Por esse motivo, o mecanismo de ação pelo qual ocorre o tratamento de processos enxaquecosos agudos ainda não foi bem esclarecido (Maldom, 2002).

1.2.3.4 Alcalóides do Ergot e Doença de Parkinson

Estudos recentes envolvendo alcalóides do ergot no tratamento da doença de Parkinson têm investigado seus efeitos nos receptores dopaminérgicos (Lange, 1998; Thompson, 2001).

Devido à semelhança da estrutura do anel *ergoline* com as monoaminas endógenas podem explicar a ação dos AE nos receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos. O primeiro alcalóide a ser usado com essa indicação foi a bromocriptina, que se mostrou ser uma potente agonista do receptor D₂ dopaminérgico, com efeito antagonista fraco no receptor D₁. O derivado sintético do ergot pergolida é um agonista de ação prolongada nos receptores D₂ dopaminérgicos e, diferentemente da bromocriptina, apresenta uma ação moderada nos receptores D₁. Ambos são eficazes no alívio dos sintomas da doença de Parkinson e podem levar a uma redução nas flutuações *on-off* e apresentam, praticamente, os mesmos efeitos adversos (Lange, 1998).

Outro derivado do ergot, lisurida, apresenta efeito de estimulação estriatal dos receptores dopaminérgicos D₂ e, assim como o pergolida, tem ação moderada no D₁. Por ser muito solúvel em água, é usado em terapias por via parenteral, o que pode resultar em um efeito de controle motor das flutuações da doença, por permitir a possibilidade de tratamento em infusão constante. Porém, esse tipo de tratamento apresentou ser responsável pela alta incidência de efeitos adversos psiquiátricos, possivelmente devido as suas propriedades serotoninérgicas (Reichmann, 2006).

1.3 DIIDROERGOCRISTINA

Diidroergocristina (DHEC) é um composto diidrogenado derivado do alcalóide ergocristina e vem se mostrando como um novo fármaco para a terapêutica das doenças circulatórias, de uma comprovada atividade adrenolítica e bradicardizante (Coppi, 1992a). Devido à sua atividade, provoca uma ação tônica na região venosa, assegurando, desta forma melhor irrigação periférica dos tecidos.

É, portanto, indicado na terapia de distúrbios vasculares da região cerebral, cardíaca e periférica (Coppi, 1992b).

A atividade terapêutica da diidroergocristina se processa por dois mecanismos distintos: promove ação dilatadora sobre as arteríolas e uma ação tônica-parietal sobre os vasos dilatados. Dessa forma, sua ação pode ser considerada como reguladora do tônus vascular cerebral, ou seja, é por excelência um medicamento vaso-regulador (Coppi, 1992b)

Uma propriedade particular da diidroergocristina é a de inibir a agregabilidade plaquetária induzida pela adrenalina, serotonina e ADP. Essa propriedade torna-se importante frente aos conhecimentos relativos dos acidentes vasculares cerebrais de tipo isquêmico (AVC), decorrentes de processos tromboembólicos. Sabe-se que nessas circunstâncias existe uma participação ativa das plaquetas na patogênese dos distúrbios vasculares cerebrais. O aumento da atividade biodinâmica das plaquetas está associado ao aumento da deficiente agregação espontânea e da agregação induzida pelo ADP, bem como da agregação secundária (Coppi, 1992b).

Inibir a agregação plaquetária proporciona um benefício adicional aos pacientes com vasculopatias cerebrais e que são propensos à formação de trombos junto ao endotélio vascular.

Foi observado, também, a capacidade da diidroergocristina em promover a redução dos sintomas subjetivos, tais como: cefaléia, vertigens, zumbidos, estados confusionais, insônia, dificuldade de concentração e amnésia, todos eles característicos do processo de arteriosclerose cerebral (Castelli, 1977; Calisti, 1977; Morachini, 1978).

Comprovou-se também a capacidade de produzir certas modificações do tono vascular, apropriadas para corrigir uma circulação regional deficitária, levando a melhora das condições de irrigação sanguínea local e, conseqüentemente, a funcionalidade dos órgãos atingidos (Roquebert, 1984).

1.3.1 PROPRIEDADES QUÍMICAS

O nome alternativo para a molécula da DHEC é (5'a,10a)-9,10-Diidro-12'-hidroxi-2'-(1-metiletil)-5'-(fenilmetil)ergotaman-3',6',18-trione; possuindo uma fórmula molecular de $C_{35}H_{41}N_5O_5$. Possui um peso molecular de 611,73 g/mol e uma fórmula estrutural de acordo com a figura a seguir (Figura 1):

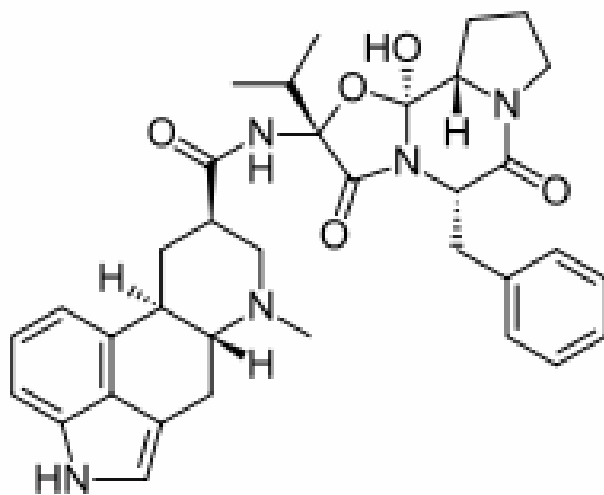


Figura 2: Estrutura química da Diidroergocristina (Drago, 1988).

1.3.2 INDICACÕES

As principais indicações da DHEC envolvem distúrbios vasculares cerebrais e periféricos (Castelli 1977; Calisti 1977; Morachini 1978). Há relatos também de uso em idosos que experimentaram acidente vascular cerebral (Bronzini 1967; Klein 1973),

hipertensão (Szam 1970; Martinetti, 1970; Bandoh 1977) e demência senil do tipo Alzheimer em associação ou isolada (Milvio 1992).

Nos dias atuais, é possível encontrar esta droga em associação com outros medicamentos em indicação para enxaqueca, como ISKEMIL[®], ISKEVERT[®], ISKETAM[®], NOROGIL[®] e VERTIZINE D[®].

1.3.3 CONTRA-INDICAÇÕES

A superdosagem pode resultar em presença de ergotismo crônico no paciente, especialmente após administração a pacientes com infecções graves como a febre puerperal e a pacientes com hipertiroidismo (ISKEMIL[®] Monografia)

1.3.4 PRECAUÇÕES

A administração de diidroergocristina deve ser evitada durante o 1^o trimestre de gestação, nas septicemias severas ou persistentes e nos pacientes portadores de insuficiência hepática ou renal grave.

É necessária cautela na presença de bradicardia grave (ISKEMIL[®] Monografia)

1.3.5 EFEITOS COLATERAIS

São raros os efeitos colaterais, podendo ocorrer ocasionalmente discreta obstrução nasal, náusea transitória e distúrbios gástricos, normalmente prevenidos pela administração do medicamento com alimentos.

Poderá ainda, ser observada discreta sonolência que tende a desaparecer com a diminuição da posologia inicial (ISKEMIL[®] Monografia).

1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DE FÁRMACOS

1.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massa.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (Collins, 1997; Burtis, 1970).

Para o acompanhamento de fármacos *in vivo* são utilizadas metodologias analíticas capazes de quantificar e identificar com precisão e exatidão os mesmos em fluídos biológicos. Uma das técnicas mais empregadas para este tipo de análise é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na utilização desta técnica as amostras devem passar por um processo de purificação. Na rotina, as técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes no fluído biológico são: extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Collins, 1997)

A extração líquido-líquido é vantajosa por ser simples e pela variedade de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, ocorre a desnaturação das proteínas presentes na amostra, eliminando, assim, a contaminação da coluna cromatográfica.

Esse tipo de extração, porém, possui algumas desvantagens: as amostras que possuem grande afinidade pela água, que são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultam em perda do analito. É necessária a utilização de solventes ultrapuros, uma vez que impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra. O grande volume de solvente utilizado acaba gerando problemas de descartes, além de ser um processo susceptível a erros e de difícil automação. Apesar destas desvantagens, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de pré-tratamento de amostra.

Para o uso da extração líquido-líquido em fluídos biológicos primeiramente é necessária a escolha adequada do solvente orgânico e ajuste do pH da amostra para que ocorra uma boa recuperação do analito. Vários tipos de solventes orgânicos são utilizados para extração de drogas ácidas e básicas presentes na amostra de fluídos biológicos. Quanto maior a afinidade do analito pelo solvente orgânico maior a recuperação. Substâncias básicas são normalmente extraídas em pH maior que 7,0 e extração de substância ácida em pH menor que 5,0. Este tipo de extração é muito utilizado para substâncias presentes em fluídos biológicos (Collins, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência é o mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. Utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. As colunas utilizadas são muito eficazes, porém oferecem grande resistência à vazão da fase móvel. Por esta razão, é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna analítica.

Pode-se dizer, então, que essa técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos

de amostras, com adequada resolução, eficiência e sensibilidade. A detecção contínua e com grande reprodutibilidade fornecida por esta técnica eleva as análises qualitativa e quantitativa a um alto nível de exatidão e precisão (Collins, 1997; Silverstein, 2000).

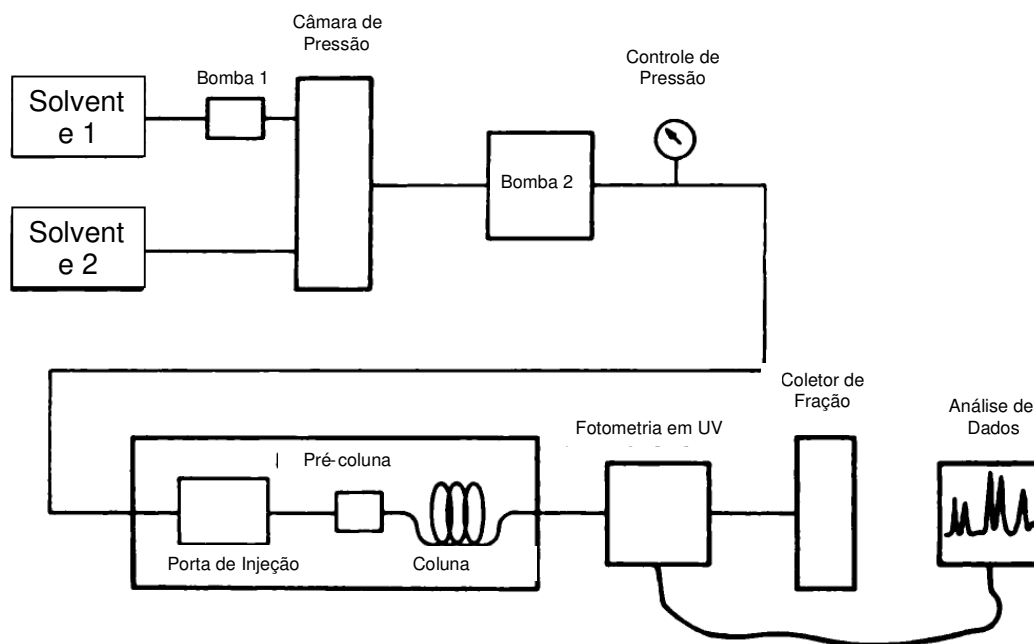


Figura 3: Esquema de funcionamento do HPLC (Burtis, 1970)

1.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa é uma técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades tão pequenas como 10^{-15} g para um composto de massa de 1000 dalton. Isto significa que os compostos podem ser identificados em concentrações muito baixas (da ordem de 10^{-12}) em misturas quimicamente complexas (Silverstein, 2000).

Comparável ao excitante desenvolvimento da ressonância magnética nuclear durante as últimas três décadas, a espectrometria de massa entrou em uma fase de crescimento acelerado nos anos oitenta, começando com a introdução de métodos de ionização. É incrível a velocidade com a qual a espectrometria de massa tem se expandido dentro de áreas de pesquisa, nas quais, tradicionalmente, era limitado o seu uso (Siuzdak, 2004; Audi, 2006).

No começo da década de 40, Lawrence desenvolveu uma separação baseada em espectrometria de massa para melhorar a radioatividade do urânio ^{235}U da distribuição isotópica normal (Smith, 1947; Audi, 2006). Como parte do projeto Manhattan, Lawrence aplicou esse método para purificação do ^{235}U radioativo, o qual foi então usado para construir a primeira bomba nuclear. Desde então, estes experimentos iniciais destinados à geração e separação de isótopos de urânio estão bem estabelecidos. Até agora, a separação de compostos baseados na massa é, certamente, uma idéia intrigante da qual não se perde o interesse (Siuzdak, 1999).

A ciência da espectrometria de massa sofreu dramáticas mudanças na década passada e a expansão da sua utilidade tem aumentado, como na extensão da massa e sensibilidade da instrumentação. Mais especificamente, a espectrometria de massa de eletrospray (Fenn, 1989) tem sido aplicada em diversas áreas, além da rotina da determinação molecular, especialmente na química e bioquímica (Siuzdak, 1996).

Associada a esse procedimento, a técnica de impacto de elétrons (EI) é comumente usada para a identificação de moléculas químicas. Através da combinação de técnicas analíticas de cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massa (MS), os componentes de uma amostra podem ser separados pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) que envolve a utilização de uma coluna cromatográfica; e caracterizados pela obtenção de seu peso molecular no sistema de espectrometria de massas quadrupolo.

Nessa técnica, um espectrômetro de massas lança um feixe de elétrons de alta energia sobre moléculas em estado de vapor, tendo como finalidade o registro do impacto

desses elétrons em forma de espectro. Os íons são identificados de acordo com a sua relação entre massa e carga (m/z).

O espectro é apresentado em forma de gráfico (picos), geralmente, na associação da abundância relativa do íon na amostra e sua relação m/z .

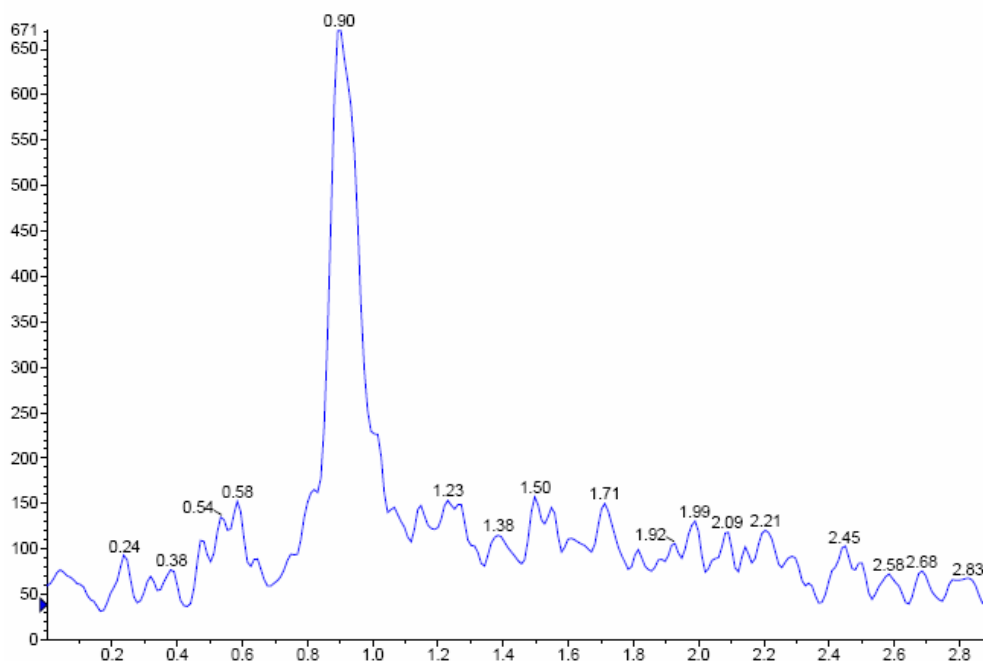


Figura 4 – Visualização de exemplo de espectro em espectrometria de massa.

Devido o bombardeio de elétrons, a molécula perde 1 (um) elétron de seu composto, formando o chamado íon molecular (ou íon principal), que corresponde a molécula intacta com carga positiva de +1, devido a perda do referido elétron.

1.4.3 IONIZAÇÃO DA MOLÉCULA

Uma das técnicas de ionização, em maior expansão, é por *eletrospray* que passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento. A primeira ocorreu antes de 1970 e centrou-se mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga,

como torná-lo viável, cabendo, aqui, salientar o trabalho realizado por Dole *et al.*, 1968. A segunda fase deu-se a partir de 1970 com destaque para o trabalho desenvolvido em 1984 por Yamashita e Fenn (Henion, 2009), considerado pioneiro da espectrometria de massa de ionização por *eletrospray* (IES). A partir deste trabalho, a técnica sofreu um aperfeiçoamento notório com o desenvolvimento e construção de fontes iônicas comercializáveis baseadas no princípio de carregar gotas eletricamente.

Há, essencialmente, três características que a diferencia das outras técnicas de ionização. A primeira delas é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, tornando possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último e não menos importante, há o fato de ser o *eletrospray* uma técnica de ionização suave, permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa. (Siudzak, 2004)

O desenvolvimento da espectrometria de massa de IES permitiu, assim, novas possibilidades para análise de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos, incluindo proteínas, nucleotídeos e polímeros sintéticos, sendo por isso uma técnica muito usada em diversas áreas de pesquisa.

A produção de íons em *eletrospray* requer essencialmente dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica, seguida de evaporação da gota em condições que a permitam. (Siudzak, 2004)

As soluções são primeiramente pulverizadas eletrostaticamente com formação de gotas pequenas e altamente carregadas. A nebulização da solução é, em alguns casos, facilitada pela ajuda de um gás nebulizador. Posteriormente, as moléculas de analito devem de alguma forma ser separadas do solvente na forma de íons. Este passo de formação de íons, como em muitas das técnicas de ionização consideradas suaves, é provavelmente o menos compreendido no processo global do *eletrospray*. Alguns

mecanismos têm sido propostos para a desadsorção de íons a partir de gotas carregadas, sendo que o modelo de resíduo de carga de Dole *et al.*, 1968; aplicado a macromoléculas, foi, talvez, o primeiro a servir de base para a atual técnica de *eletrospray*. Nesse modelo é considerado que, à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga à superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb, entre as cargas superficiais, excederão a tensão superficial levando à divisão da gota inicial. Se esse processo de divisão continuar e se a solução original for suficientemente diluída, será alcançado um estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja, formar-se-ão macro íons. (Siudzak, 2004)

Um outro mecanismo, para a geração de íons pequenos, o da evaporação iônica, foi proposto por Iribarne e Thomson em 1976 (Costa, 2008) que sugeriram que a evaporação do solvente conduz a uma instabilidade das gotas com razões elevadas de densidade de carga superficial/raio da gota. A energia eletrostática associada com a gota carregada torna-se, então, suficientemente grande para desadsorver íons do analito para a fase gasosa.

Este mecanismo foi aplicado a macromoléculas por Fenn, 1989; o qual propôs que, uma parte da molécula carregada podia penetrar a superfície da gota, devido a movimento Browniano. A existência de repulsão coulombiana, entre esta parte da molécula e a superfície da gota, puxará a molécula para fora da gota.

Muitos são os sistemas de *eletrospray* que têm sido construídos (Cole, 1997; Niessen, 2006), diferindo, entre si, em alguns dos componentes. Porém, na sua essência, são constituídos por um sistema de introdução de amostra, região da fonte onde os íons são gerados, um orifício para amostragem de íons e um sistema de transferência iônica, onde os íons são transportados para o analisador de massa (Figura 5).

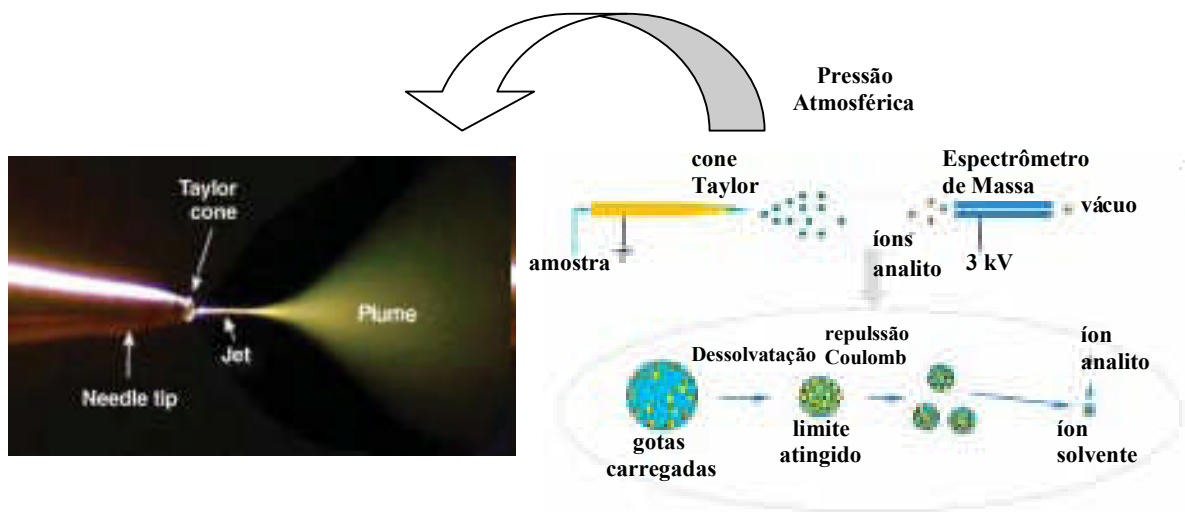


Figura 5 – Esquema de funcionamento do sistema de *eletrospray* (Martins, 2006).

Em primeiro lugar, temos um capilar de aço inoxidável, mantido a um potencial relativamente elevado em relação a um contra-eletrodo, onde o analito em solução é introduzido e pulverizado na sua extremidade, sendo que o sinal do potencial aplicado determina a polaridade das gotas e dos íons formados. A pressão entre o capilar e o contra-eletrodo é a pressão atmosférica, sendo em seguida os íons amostrados através de um cone ou orifício, passando os íons para uma zona intermediária, mantida a uma pressão mais baixa por meio de uma bomba rotatória. Os íons atravessam, em seguida, uma escumadeira ou “armadilha de íons” (*skimmer*), em direção ao analisador, que se encontra a alto vácuo. O *skimmer* funciona como um separador de momento, sendo que os íons analito mais pesados passam através dele, enquanto que as moléculas mais leves de gás e solvente são bombeadas (Figura 6).

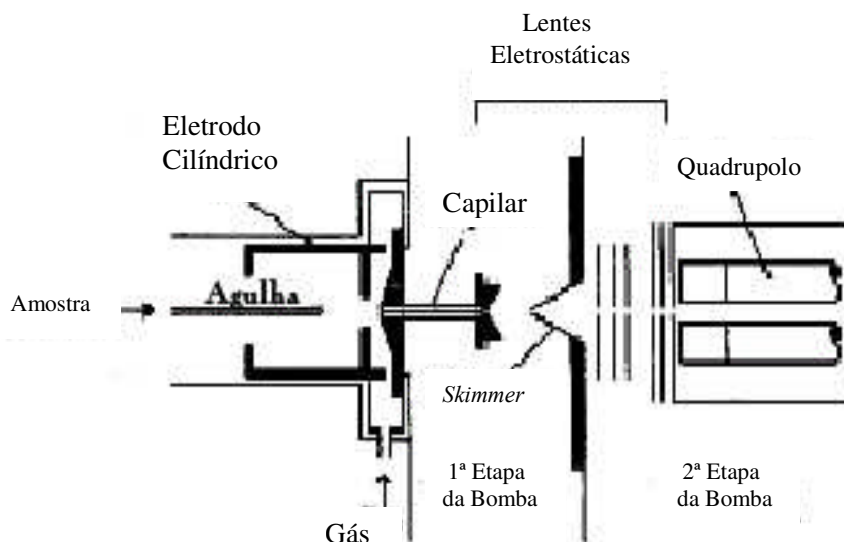


Figura 6 – Desenho esquemático de introdução da amostra em um espectrômetro de massa por um sistema de *eletrospray* (Martins, 2006).

A IES através da espectrometria de massa sofreu um rápido crescimento, tornando-se, assim, uma técnica analítica fundamental para análise de uma vasta gama de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis, indo de compostos de baixa massa molecular até biopolímeros de elevada massa molecular (Costa, 2008).

Os melhores resultados analíticos são, em geral, obtidos para analitos que são iônicos em solução e, é de se acreditar que os íons observados na fase gasosa são, pelo menos, um reflexo qualitativo dos íons na solução da amostra original, retendo aspectos da sua estrutura e associações não covalentes. O maior sucesso da técnica tem sido na sua aplicação na análise de moléculas biológicas não voláteis (Costa, 2008).

Em princípio, todas as moléculas que podem ser carregadas são acessíveis a uma análise por espectrometria de massa. Entre estas, encontram-se os peptídeos e proteínas que podem ser protonados principalmente nas zonas básicas, ou seja, nos grupos

terminais amino. Os oligonucleotídeos podem ser carregados no modo iônico negativo. Neste caso, o grupo fosfato fornece a carga por abstração do próton. Moléculas neutras, tais como oligossacarídeos, podem também ser detectadas, porque podem se ligar a íons sódio ou outros metais alcalinos como agente de carreamento (Costa, 2008).

1.4.4 ANÁLISE DE RESULTADOS A PARTIR DA TÉCNICA DE ESPETROMETRIA DE MASSA

Pelo fato da molécula adquirir um caráter catiônico, muitas vezes, torna-se desequilibrada eletronicamente, o que resulta na dissociação de seus componentes para a formação de íons menores e mais estáveis, de acordo com a presença de seus componentes químicos.

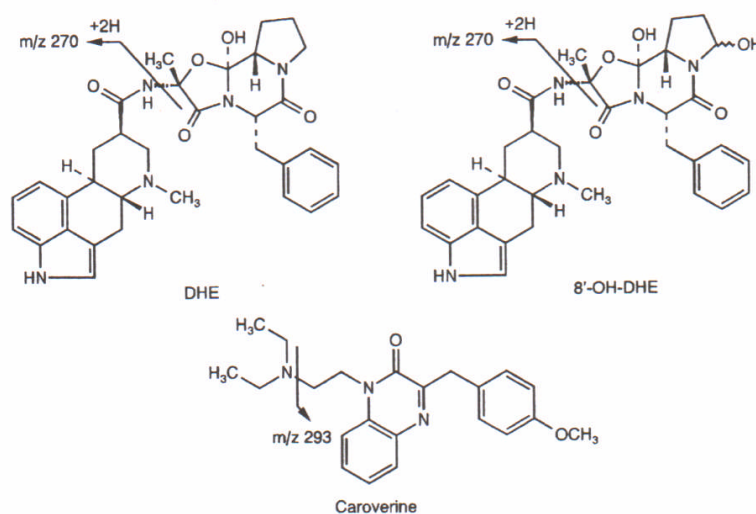


Figura 7 – Moléculas da Ergotamina, seu metabólito (8'-hidroergotamina) e Caroverina e o ponto de quebra (seta) para a formação de íons menores e mais estáveis (Chen, 2002).

A capacidade de identificação dos picos do íon molecular e de seus fragmentos não está relacionada somente com a abundância da molécula presente na amostra. O espectro formado deve ser claramente capaz de caracterizar e separar os picos adjacentes

aos picos dos isótopos principais, ou seja, a relação m/z de cada íon deve ser muito bem definida (Holcapek, 2008).

O grau de resolução do espectro deve ser capaz de definir uma diferença de, pelo menos, 10% entre a intensidade do pico do íon molecular e de seus adjacentes. Essa resolução (R) se dá pela razão entre a massa do maior pico e a diferença entre as massas do maior pico e seu adjacente mais próximo (de menor massa).

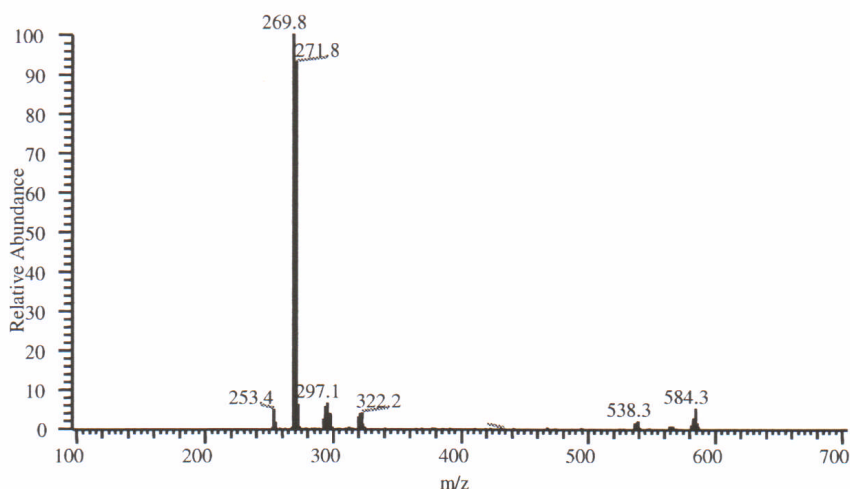


Figura 8 – Resolução de espectro na definição de massa do íon da Dihidroergotamina e íons adjacentes (Chen, 2002).

Devido à capacidade de elucidação de estruturas para a seleção de possíveis fórmulas de moléculas químicas, os espectrômetros de massas podem ser divididos de acordo com o método de separação de íons (Holcapek, 2008).

1.4.5 – DEFLEXÃO EM CAMPO MAGNÉTICO

No método de Campo Magnético Simples, a amostra inserida adquire forma de vapor. O feixe de vapor formado entra em uma câmara de ionização e sofre um bombardeio de elétrons de alta energia que se desprendem de um filamento aquecido e perpendicular ao feixe da amostra. Seguente a colisão, os compostos presentes na amostra perdem 1 (um) elétron e os íons positivos formados sofrem ação de um campo

eletrostático que provoca a passagem dos mesmos, dessa região, por uma fenda de aceleração. Os íons, então, sofrem a ação de um outro campo eletrostático de caráter mais forte que tem como objetivo ajustar a velocidade de lançamento desses isótopos para o tubo analisador (PE Sciex, 2004).

No tubo em questão, é possível perceber a presença de um campo magnético, onde a variação de sua intensidade é responsável pela característica do espectro. Ao final do tubo, um coletor se responsabiliza pela seleção de íons a serem analisados, devido a presença de uma fenda de colimação que permite a passagem de um conjunto de íons de cada vez (PE Sciex, 2004).

Com o aumento da aceleração dos íons em direção do analisador e a presença de um campo magnético para a focalização da amostra, é possível aumentar a resolução do espectro. Esse processo resulta em uma obtenção mais precisa da massa do íon, que pode chegar a quatro décimos do valor da massa inteira do íon. Esta técnica é chamada de Focalização Dupla (Silverstein, 2000).

1.4.6 – ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (MS) QUADRUPOLO

A instrumentação caracterizada pelo uso do método Quadrupolo envolve a utilização de quatro barras arranjadas ao redor de quatro cantos, adquirindo uma estrutura quadrangular. Aplicando a combinação simultânea de uma voltagem de corrente contínua e de uma voltagem de radiofrequência a essas barras, origina-se a diferença de um potencial de ação, o que caracteriza um mecanismo de filtro a esses pólos (PE Sciex, 2004). (Figura 9).

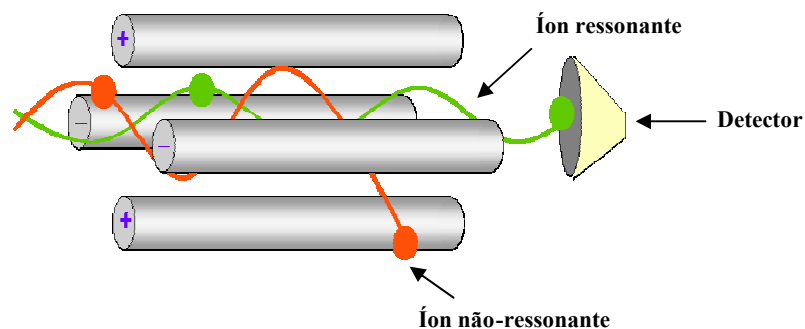


Figura 9 – Esquema de funcionamento do método Quadropolo em espectrometria de massa (Martins, 2006).

O espectrômetro de massas em ionização atmosférica por pressão (API) caracteriza esse tipo de instrumentação (PE Sciex, 2004).

As principais características dos espectros de massa de biomoléculas são a predominância de íons moleculares multiplamente carregados e a ausência de fragmentação que permitem a determinação rigorosa de massas moleculares. No entanto, no que diz respeito à estrutura molecular, pouca informação, em geral, é obtida. A dissociação pode ainda ser provocada por ativação colisional na região de decomposição de um espectrômetro acoplado a outro (MS/MS), sendo esta técnica relevante na obtenção de informação estrutural de moléculas. Uma mistura de compostos é introduzida e, com o primeiro espectrômetro de massa, seleciona-se um íon de interesse. Este é depois dissociado entre os dois espectrômetros, geralmente por colisão com gás argônio a uma certa pressão, transformando a energia cinética em energia vibracional (PE Sciex, 2004).

1.4.6.1 – Espectrômetro de Massa Quadrupolo Simples (SINGLE QUAD)

Essa configuração possui um único analisador de espectro de massas. Na realidade, a configuração *Single Quad* possui dois sistemas de barras quadrupolos, porém os primeiros instrumentos possuíam uma seqüência de lentes ópticas ionizadas para a transmissão de íons dentro do único sistema quadrupolo existente (PE Sciex, 2004).

Hoje, um sistema de transmissão em barras quadrupolo (Q0) foi adicionado anteriormente ao sistema responsável pela filtração dos íons, mas o termo *Single Quad* nunca foi modificado. Portanto, o sistema quadrupolo pode ter função de transmissão ou de servir como um dispositivo de filtração de íons (PE Sciex, 2004).

O mecanismo tem início quando, após o processo de bombardeio de elétrons as moléculas em estado de vapor, os íons formados atravessam o primeiro sistema quadrupolo em velocidade constante, numa direção paralela aos pólos. Isso se deve ao fato de que na região Q0 o primeiro sistema quadrupolo atua como um “funil iônico”, onde há presença apenas da voltagem RF que atua na propagação dos íons. Devido uma pressão constante em Q0, os íons são conduzidos em grupos compactos sob um efeito de colisão direcionada (*collisional focusing*), o que melhora a eficiência na segunda fase de filtração do sistema (PE Sciex, 2004).

Já no segundo sistema quadrupolo presente Q1, devido a diferença de voltagem DC e RF presente no campo, ocorre um oscilação dos íons devido sua relação m/z . Assim, somente os íons com oscilações “estáveis” as condições determinadas na região, conseguem alcançar o final do campo. Os demais, devido não corresponder às condições necessárias, apresentam oscilações maiores, provocando a colisão dos mesmos nos pólos e, conseqüentemente, a destruição dos mesmos (PE Sciex, 2004).

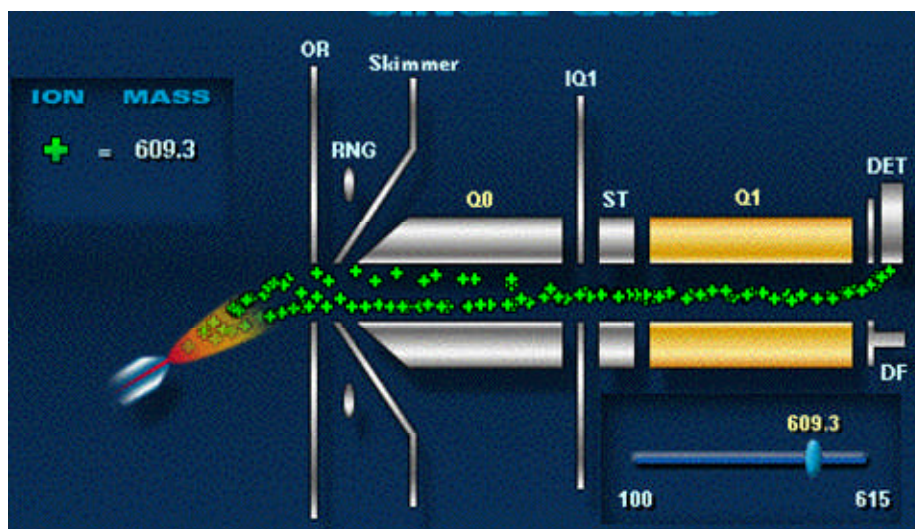


Figura 10 – Sistema de Espectrometria de Massa Quadrupolo Simples (PE Sciex, 2004).

Após a passagem dos íons pelo campo quadrupolo, os mesmos são capturados, geralmente, pelo sistema de escumadeira ou “armadilha de íons”. Esse sistema consiste, basicamente, em uma filtração de íons por uma configuração esférica que os retêm, temporariamente, no sistema de captura. Somente após um período determinado, os íons sofrem ação de varredura de um campo elétrico e chegam ao detector para formação do espectro (PE Sciex, 2004).

Outro método Quadrupolo Simples de detecção de íons é o modo de varredura (*scanning*). Neste modo um intervalo de massa é determinado onde a massa de um íon específico é selecionada. Assim, somente o íon selecionado, que se encontra dentro do intervalo de massa definido, é transmitido para o detector (PE Sciex, 2004).

Uma outra maneira de detecção é por monitoramento de um íon selecionado. Neste modo a câmara Q1 pode monitorar a massa de um íon específico ou variar entre mais de uma massa previamente especificada. Dessa maneira, a massa de um único íon é permitida para atravessar em sentido do detector em um dado tempo de análise (PE Sciex, 2004).

Essa técnica é usada, principalmente, para quantificação de espécies já conhecidas em um instrumento de um único quadrupolo (PE Sciex, 2004).

1.4.6.2 – Espectrometria de Massa em Sequência (TRIPLE QUAD)

Uma segunda configuração existente dentro do sistema quadrupolo possui dois analisadores de espectrômetro de massa e uma célula de colisão. Esse instrumento é referido como Espectrometria de Massa em Sequência (MS/MS). Novamente, pelo fato dos primeiros aparelhos não possuírem o Q0, somente três sistemas de barras de quadrupolos eram observados e, por esse motivo, assim chamados de Quadrupolo Triplo (*triple quad*) (PE Sciex, 2004)..

Os dois primeiros sistemas, Q1 e Q0, atuam da mesma forma da configuração *Single Quad* descrita anteriormente. Contudo, ao contrário dos íons serem captados por um detector após a fase Q1, os mesmos seguem para um segundo espectrômetro de massas Q2 (PE Sciex, 2004).

Também chamado de célula de colisão ou câmara de colisões, Q2 caracteriza-se pela presença de um gás (comumente o gás hélio) que torna a câmara um campo de colisões dos íons remanescentes da fase Q1. Esse processo tem por finalidade a formação de fragmentos ou “íons secundários” que serão transmitidos para um terceiro espectrômetro de massas, chamado Q3 (PE Sciex, 2004).

Devido a ausência de campo magnético e a presença de uma alta pressão na câmara Q2, os íons secundários sofrem o mesmo efeito de organização em grupos, que são observados na câmara Q0. O quadrupolo Q3 também utiliza as voltagens DC e RF (da mesma maneira e intensidade presentes na câmara Q1) com o propósito de filtrar os íons secundários, permitindo apenas íons de relação m/z com massa selecionada passarem em direção ao detector (PE Sciex, 2004).

Obtém-se, assim, um espectro de massas para cada íon selecionado no primeiro espectrômetro, formando picos de “íons secundários”.

Deve-se ressaltar, também, que os instrumentos Quadrupolo Triplo podem atuar como Quadrupolo Simples unicamente. Nesse método, a câmara de colisão não possui gás, onde os íons são apenas transportados para o interior da câmara Q3, sem fragmentação. Por sua vez, a câmara Q3 possui apenas a voltagem RF onde, novamente, os íons não sofrem mais colisão ou efeito de oscilação por diferença de potencial, seguindo direto para o detector (PE Sciex, 2004). (Figura 11)

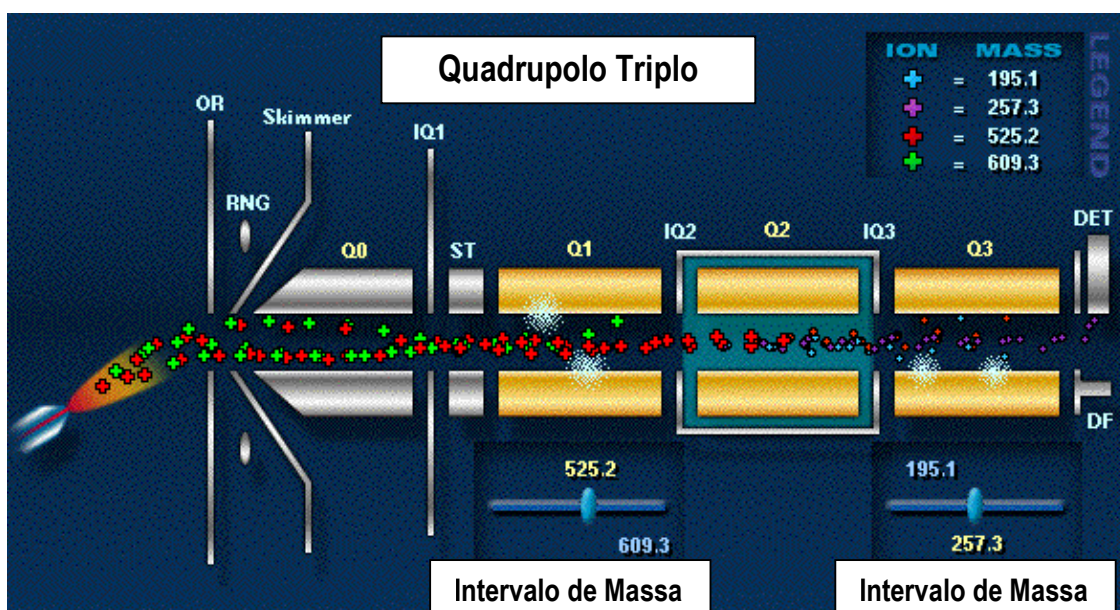


Figura 11 – Sistema de Espectrometria de Massa em Sequência (PE Sciex, 2004).

O uso mais comum da configuração MS/MS está associado no caso de análise de moléculas grandes e, particularmente, na resolução de misturas. A análise realizada no método Quadrupolo Triplo pode envolver quatro maneiras (PE Sciex, 2004).

A- Produção em Varredura (Production Scan)

Este modo é usado para análise da estrutura molecular de um íon e identificação dos íons principais. Dentro do instrumento, a câmara Q1 é ajustada para detectar uma massa específica; Q2 é preenchido com o gás de colisão para que ocorra a fragmentação

do íon selecionado e, Q3, é responsável pela seleção de íons secundários que possuam um intervalo de massa determinado, sendo possível a detecção da massa do fragmento a ser analisado (PE Sciex, 2004).

B- Varredura do Íon Precursor

A utilização deste modo objetiva determinar a “origem” de um produto em particular (fragmento) após sua passagem pela câmara de colisão. O ajuste de Q1 consiste na varredura de íons dentro de um intervalo de massa, Q2 realiza a colisão com gás e Q3 seleciona uma única massa iônica que será capaz de passar até o detector, proporcionando a identificação de um fragmento específico (PE Sciex, 2004).

C Varredura de Perda Natural

O modo envolve uma varredura de íons originados de uma perda natural da molécula durante a colisão com gás. Portanto, Q1 é novamente responsável por selecionar um íon dentro de um intervalo de massa, Q2 funciona como câmara de colisão e Q3 realiza outra varredura, porém em um intervalo de massa inferior ao realizado em Q1.

D- Monitoramento de Reação Múltipla (MRM)

MRM consistem em um modo comumente usado para quantificação de experimentos onde a identidade dos componentes já é conhecida, bem como a de seus precursores e os íons a serem formados. Assim, o MRM é baseado na determinação da “quantidade” dos componentes presentes na amostra. Mas, para isso, o espectro formado deve ser comparado com uma curva de calibração previamente realizada, utilizando desta forma padrões internos já conhecidos.

As câmaras de Q1 e Q3 são ajustadas para determinação de uma massa específica, onde Q1 detecta o íon principal e Q3 o fragmento. A associação do composto é chamado de “par”. Portanto, pode-se dizer que Q1 e Q3 realizam a varredura para detecção dos “pares” desejados.

1.4.6.3 Finalidades do uso de Espectrometria de Massa

O uso de um MS pode ser associado a quatro finalidades principais (PE Sciex, 2004):

1. Confirmar a presença de um composto.
2. Quantificar um composto usando uma curva de calibração.
3. Determinar elementos presentes dentro de uma amostra.

1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A bioanálise, talvez mais que muitos outros tipos de análises, envolve fatores desconhecidos tais como baixas concentrações do analito e matrizes complexas que podem conter componentes desconhecidos e variáveis (Leite, 2002).

Métodos bioanalíticos, quando bem desenvolvidos, validados e empregados para determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas, são um fator determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis que são usados na avaliação e interpretação dos resultados obtidos após execução de estudos de biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética, toxicocinética e química analítica (Leite, 2002).

Sabe-se que muitas técnicas analíticas já desenvolvidas e validadas são constantemente adaptadas, a fim de atender as exigências requeridas para a finalidade a ser empregada. É também importante enfatizar que cada técnica analítica possui suas próprias características que variam de analito para analito (Leite, 2002).

Quando se pensa em validar ou verificar se um determinado método é confiável para o analito ou espécie a ser analisada na amostra que estará sendo utilizada, todo o sistema ao redor desta metodologia deve atender todos os critérios de confiabilidade. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (Leite, 2002).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (por exemplo, estudos de equivalência farmacêutica) e em matrizes biológicas (por exemplo, estudos de bioequivalência). As técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina são a cromatografia gasosa (GC), HPLC e estas

combinadas com a espectrometria de massa, tais como: LC-MS, LC-MS-MS, CG-MS e CG-MS-MS (Shah *et al.*, 2000).

1.5.1 PRÉ-REQUISITOS PARA VALIDAR UMA METODOLOGIA BIOANALÍTICA

A realização de uma pesquisa bibliográfica é a primeira etapa para a busca do método bioanalítico. Uma vez existindo o método, ele deverá ser testado quanto a sua reprodutibilidade. Na inexistência de uma metodologia bioanalítica para um determinado fármaco, deve-se desenvolver um método estabelecendo todos os parâmetros de validação, que responda satisfatoriamente à aplicação desejável.

A pesquisa clínica com medicamentos requer a participação de voluntários humanos que não podem ser envolvidos no estudo, sem a certeza de que seus sacrifícios resultem em um benefício para a sociedade. A certeza desses resultados para os voluntários só pode ser garantida se o método analítico para realização do estudo tiver sido desenvolvido previamente de forma a assegurar que os fluídos biológicos obtidos dos voluntários serão devidamente analisados (Brasil, 2002).

No desenvolvimento de um método é necessário verificar toda a metodologia de preparação da amostra, a qual envolve os processos de extração, separação, purificação, identificação e quantificação do fármaco na matriz biológica. Para tanto, alguns estudos preliminares de validação devem ser efetuados visando à determinação dos seguintes parâmetros: exatidão (repetitividade), precisão (reprodutibilidade), recuperação, linearidade (curva de calibração), especificidade e estabilidade (Brasil, 2003).

O alcance da validação de uma metodologia depende integralmente da padronização dos processos associados, para que a mesma possa ser reprodutível em diferentes laboratórios. Tal processo se dá por estabelecer procedimentos operacionais padrões (POPs), os quais devem contar a descrição das atividades relacionadas a metodologia (Buick, 1990).

1.5.1.1. Especificidade/Seletividade

Seletividade é a habilidade de um método analítico em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra denominados interferentes. Os interferentes podem ser originários de fontes endógenas (metabólitos e/ou precursores; produtos de degradação do fármaco; co-administração de fármacos, vitaminas e/ou seus metabólitos, produtos de interação de fármaco, componente biológico e outras substâncias que ocorrem naturalmente em fluidos biológicos, isto é, hormônios, proteínas, lipídios, substâncias dietéticas, etc) e/ou exógenas (impurezas dos reagentes usados, substâncias liberadas pelos recipientes em uso ou resultantes de lavagem inadequadas de vidrarias, equipamentos e instrumentos).

Os níveis de interferentes devem ser avaliados antes de iniciar o desenvolvimento do método. Uma vez que o método esteja no estágio de validação, o teste de seletividade deve assegurar níveis e reprodutibilidade dos interferentes e o seu impacto na precisão e exatidão do método em relação ao limite de quantificação (Brasil, 2002).

Para a seletividade, análises de amostras branco da matriz biológica apropriada (plasma, urina ou outra matriz) devem ser obtidas de, pelo menos, seis fontes. Cada amostra branco deve ser testada para interferentes, e a seletividade deve ser assegurada no limite de quantificação (Braggio, 1996).

Substâncias potencialmente interferentes numa matriz biológica incluem componentes endógenos da matriz, metabólitos, produtos de decomposição e durante o estudo, medicação tomada concomitantemente e outros possíveis interferentes. Se o método for usado para quantificar mais de um analito, cada analito deve ser testado para assegurar que não há interferência. Para verificar este item, recomenda-se que sejam utilizadas as seguintes amostras: 04 lotes de plasma normal, 01 lote de plasma lipêmico e 01 lote de plasma hemolisado (Hartmann, 1998).

Para verificar a interferência, trabalhar com adição de padrão sobre os plasmas em três concentrações distintas (alta, média e baixa) em triplicata por concentração (Brasil, 2003).

1.5.1.2. Curva de Calibração/Linearidade

O método analítico em desenvolvimento deve atender aos requisitos de sensibilidade e detectabilidade planejados para o fármaco em função das suas concentrações plasmáticas na curva farmacocinética. Dessa forma, visando a determinação da faixa de concentração onde a resposta é linear e o respectivo limite de quantificação, é necessário determinar a relação concentração do fármaco *versus* resposta do detector - curva de calibração (Kimanani, 1998).

Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Um número suficiente de padrões deve ser usado para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. Uma curva de resposta deve ser preparada na mesma matriz biológica que as amostras de um estudo, adicionando na matriz as concentrações conhecidas do analito. O número de padrões usados na construção de uma curva de resposta será uma função dos valores analíticos esperados no estudo e da relação analito/resposta. Uma curva de calibração deve consistir de uma amostra “branco” (matriz processada sem o padrão interno), uma amostra “zero”, se pertinente, (matriz processada com o padrão interno) e seis ou mais amostras intermediárias cobrindo a faixa esperada, incluindo o limite de quantificação (Boulanger, 2003).

1.5.1.3. Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados médios obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do

fármaco. A exatidão e precisão são determinadas pela análise de amostras em replicata, contendo quantidades conhecidas do analito. A exatidão e precisão devem ser medidas usando um mínimo de 5 determinações por concentração. Um mínimo de três concentrações (controles de qualidade baixo, médio e alto) pertinente a toda faixa de estudo é recomendado. A precisão e exatidão determinadas a cada nível de concentração não devem exceder 15% em coeficiente de variação (CV) exceto no limite mínimo de quantificação, o qual não devemos desviar mais de 20% em CV (Bressole, 1996).

A precisão e exatidão são posteriormente subdivididas em precisão/exatidão “intralote”, que fornece a precisão e exatidão durante uma única corrida analítica, e precisão/exatidão “inter lote” que mede a precisão e exatidão ao longo do tempo, podendo envolver diferentes analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios (Bressole, 1996).

Uma vez que o método analítico foi validado para uso rotineiro, sua exatidão e precisão devem ser monitoradas regularmente para assegurar que o método continua a ter um desempenho satisfatório.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média determinada}}$$

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

1.5.1.4. Limite de Detecção/Sensibilidade

Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o limite de detecção seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (Brasil, 2003; Buick, 1990).

1.5.1.5. Limite de Quantificação

Estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação deve ser, no mínimo, 5 vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo no tempo de retenção do fármaco (Brasil, 2003).

1.5.1.6. Recuperação

A Recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantidade de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada à eficiência do método analítico de separação, dentro dos limites de variabilidade. A recuperação de um analito não precisa ser 100%, mas a quantidade de analito recuperado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível. Experimentos para recuperação devem ser feitos comparando resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com soluções-padrão não extraídas nas mesmas concentrações representando 100% de recuperação (FDA, 2001).

O percentual recuperado deve ser tal que não interfira na quantificação da corrida analítica que se segue. O percentual de recuperação desejado é, na realidade, função da

relação da detectabilidade do método com o limite de quantificação necessário. Por exemplo, se em função da faixa de concentração pertinente ao ensaio for necessário obter um limite de quantificação na matriz biológica antes da separação de 10 ng/mL e em meio biológico pós-separação detectar-se com confiabilidade 6 ng/mL, a recuperação necessária será de no mínimo 60% (Brasil, 2002).

1.5.1.7. Estabilidade

O desenvolvimento do método é a etapa mais importante nos estudos analíticos de bioequivalência/farmacocinética, visto que o comportamento dos fármacos nas matrizes biológicas depende dos níveis de interferentes que interagem com a molécula ativa. Um outro aspecto a ressaltar é a mudança dos constituintes da matriz biológica submetida a processo de estocagem levando em consideração o tempo e a temperatura. Assim sendo, produtos de degradação, complexação, oxidação, metabólitos e outras substâncias alteram a resposta de um método se o mesmo não for suficientemente seletivo para os estudos com matrizes biológicas frescas e envelhecidas (Dadgar, 1995).

Os estudos prévios de estabilidade em matrizes biológicas são essenciais para fornecer os parâmetros de adequabilidade do método em amostras envelhecidas e condições de armazenamento das amostras para os estudos analíticos. Tais estudos permitem a confiabilidade necessária ao método, pois os resultados a serem fornecidos não correrão riscos de serem rejeitados por erros de metodologia, quando a amostra é submetida a processo de envelhecimento. Por outro lado, o armazenamento da amostra em uma dada temperatura por um tempo determinado deve ser baseado em dados científicos que possam afirmar que, naquelas condições de estocagem, o fármaco não sofrerá alteração.

A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos é uma função do tempo e da temperatura de estocagem, das propriedades químicas do fármaco, matriz e recipiente (Cuason, 1997). A estabilidade de um analito numa matriz particular e recipiente é relevante apenas para aquela matriz e recipiente e não deve ser extrapolada para outros

tipos de matrizes e recipientes. Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade do fármaco durante a coleta e manuseio da amostra, após estocagem de longa duração (congelamento na temperatura de estocagem pretendida), estocagem de curta duração (temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e processo analítico. As condições usadas nos experimentos de estabilidade devem ser previamente estabelecidas. O procedimento deve também incluir uma avaliação da estabilidade do analito na solução estoque (Dadgar & Burnett, 1995; Salem., 2004).

1.5.1.8. Robustez

De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2003), sugere-se que sejam feitos uma avaliação e registro das variações ocorridas durante o processo de validação da metodologia analítica. No caso de observação de algum parâmetro fora do padrão estipulado pelos POPs, deve-se seguir normas de precaução para evitar desvios de procedimentos.

Tal atividade demonstra como, normalmente, na rotina do laboratório os equipamentos, reagentes e amostras podem se comportar na análise de amostras (Brasil, 2003).

Alguns fatores são citados pela ANVISA de acordo com a etapa do processo para avaliação da robustez do método, sendo eles:

- *Preparo de Amostras*: estabilidade das soluções analíticas e tempo de extração;
- *Espectrofotometria*: variação do pH das soluções, temperatura e diferentes fabricantes de solventes;
- *Cromatografia Líquida*: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel;
- *Cromatografia Gasosa*: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e velocidade do gás de arraste.

2-OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização da química, do metabolismo e dos parâmetros farmacocinéticos da Diidroergocristina (DHEC) e do seu principal metabólito da 8-Hidroxi-Diidroergocristina (DHEC-OH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a viabilidade da utilização de técnicas *in vitro* para produção do metabólito da DHEC.
- Desenvolvimento de um método analítico sensível e seletivo para condução de estudos farmacocinéticos da DHEC em humanos.
- Caracterização química e farmacocinética do principal metabólito da DHEC.

3-ARTIGO

3.1 ARTIGOS PUBLICADOS

3.1.1 ARTIGO 1

Artigo publicado na revista *Current Drug Metabolism* em 2006, contendo a descrição do método analítico e caracterização química do metabólito da DHEC observado no presente estudo.

Pharmacokinetics of Dihydroergocristine and its Major Metabolite 8'-Hydroxy-Dihydroergocristine in Human Plasma

Beatriz Bicalho^a, Giovanni C. Guzzo^a, Sergio Lilla^a, Hilton O. dos Santos^a, Gustavo D. Mendes^a, Giuseppe Caliendo^b, Elisa Perissutti^b, Anna Aiello^c, Paolo Luciano^c, Vincenzo Santagada^b, Alberto S. Pereira^a and Gilberto De Nucci^{a,*}

^aGaleno Research Unit, R. Latino Coelho 1301, Pq. Taquaral 13087-010, Campinas - SP, Brazil, ^bDipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, via D. Montesano, 49, 80131 Napoli, Italy and ^cDipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, via D. Montesano, 49, 80131 Napoli, Italy

Abstract: Dihydroergocristine (DHEC) is a semi-synthetic drug mainly used for age-related cognitive impairment. In this study, its major metabolite 8'-hydroxy-dihydroergocristine (8'-OH-DHEC) was produced in incubates of a bovine liver preparation using dihydroergocristine mesylate (DHECM) as substrate. Purification was achieved by flash silica gel column and reverse phase liquid chromatographies, and identification was based on accurate molecular mass measurements, mass fragmentation spectra and NMR (¹H/¹³C) chemical shifts. By using the substance produced *in vitro*, a fast, sensitive, specific and robust LC/MS/MS method for the simultaneous determination of DHEC and its major metabolite in human plasma was developed and validated. Bromocriptine was used as internal standard and limits of quantification for DHEC and 8'-OH-DHEC were 10 pg/ml and 20 pg/ml, respectively. Pharmacokinetic parameters were investigated on 12 male healthy volunteers to whom a single dose of 18 mg DHECM was administered in tablets (Iskevert[®]). The peak of DHEC was 0.28 ± 0.22 µg/l, the t_{max} 0.46 ± 0.26 h, the AUC_{last} 0.39 ± 0.41 µg/l.h and the terminal elimination half-life 3.50 ± 2.27 h. The peak of 8'-OH-DHEC was 5.63 ± 3.34 µg/l, the t_{max} 1.04 ± 0.66 h, the AUC_{last} 13.36 ± 5.82 µg/l.h and the terminal elimination half-life 3.90 ± 1.07 h. Dosing of 18 mg DHECM was well tolerated, causing no adverse events.

Key Words: Dihydroergocristine, 8'-Hydroxydihydroergocristine, Pharmacokinetics, LC/MS/MS.

1. INTRODUCTION

Dihydroergotoxine is a mixture of four semi-synthetic peptine ergot alkaloids (dihydroergocristine, dihydro-alpha-ergocriptine, dihydro-beta-ergocriptine, dihydroergocornine) that have been traditionally used in the treatment of elderly patients suffering from cognitive deterioration and cerebrovascular diseases [1-3]. The drug is poorly absorbed by the gastrointestinal tract and preliminary pharmacokinetic parameters obtained by radioimmunoassay methods showed that after oral administration of therapeutic doses to humans (less than 10 mg), the plasma concentration of metabolites is several-fold higher than parent compounds [4]. Dihydroergopeptine alkaloids undergo extensive first pass metabolism and should be better understood in pharmacokinetic terms by the analysis of metabolite data. However, in the context of ergot alkaloids, accurate discrimination and measurement of parent drug and metabolites require analytical techniques highly specific and sensitive, and only recently the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) to the simultaneous determination of dihydroergotamine and its major metabolite in human plasma [5] has opened new perspectives for the assessment of more advanced pharmaceutical data.

Although dihydroergopeptine alkaloids are very similar, their individual binding to various neuroreceptors might be

remarkably different [6,7]. Therefore, the original use of the dihydroergotoxine mixture has been gradually replaced by the use of single components in order to achieve better-defined pharmacological profile and mode of action [8-11]. Increased attention to this topic prompted us to use current techniques of mass spectrometry to investigate the metabolism and pharmacokinetics of dihydroergocristine (DHEC), the dihydroergotoxine component currently used in the treatment of the Alzheimer disease [12].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase (749 U/mg prot), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form (NADP), MgCl₂·6H₂O, EDTA, bovine serum albumin (BSA) and glycerol were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sodium Chloride, phosphate salts and organic solvents (hplc grade) were from Mallinckrodt Baker (Xalostoc, Edo. de Méx., México). Dihydroergocristine mesylate was provided by Aché Laboratories (Guarulhos, SP, BR). Demineralized water was used throughout the study.

2.2. Rat Liver Microsomes

Male Sprague-Dawley rats (200 – 250 g) were provided with laboratory chow and water *ad libitum*. The livers were perfused with isotonic saline (NaCl 0.9%), blotted to dryness and then weighted. All subsequent steps were carried out at

*Address correspondence to this author at the Av. Jesuino Marcondes Machado, 415, Campinas, SP, 13092-320, Brazil; Tel: 55 (19) 3242-7133; Fax: 55 (19) 3242-7439; E-mail: denucci@dglnet.com.br

4°C. The liver was diced with scissors, diluted 1:4 (w/v) with 0.1 M Sørensen buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA. The preparation was homogenized with a Potter (Polytron PT 10-35, Switzerland) homogenizer. The homogenate was centrifuged at 12,000g for 20 min, after which the pellet was discarded and the supernatant (pre-microsomal fraction) was retained. The latter was centrifuged at 105,000g for 60 min and the pellet (microsomes) resuspended 1:2 (v/v) with 0.2 M Sørensen buffer pH 7.4 containing 20% (v/v) glycerol. Microsomes were aliquoted and stored at -80°C. Protein concentration was determined (Biuret) using BSA as standard [13].

2.3. Bovine Liver S12 and Microsomes

Freshly excised bovine liver was cut and stored at -80°C. A portion was thawed, washed with isotonic saline, blotted to dryness and weighted. All subsequent steps were carried out following the procedure described for rat liver pre-microsomal (S12) and microsomal preparations. Aliquots were stored at -80°C. Protein concentration was determined as above.

2.4. Cryopreserved Human Hepatocytes

Cryopreserved human hepatocytes were obtained from *In vitro* Technologies Inc. (Baltimore, MD). These hepatocytes were stored in liquid N₂ until use. Thawing was achieved by placing the vials on ice. As soon as all content had been thawed, the hepatocyte suspension was used, without previous determination of viability.

2.5. *In vitro* Metabolism Experiments

The analytical scale screening for DHEC metabolites was performed in incubates of rat liver microsomes (1 mg prot/ml), bovine liver microsomes (1 mg prot/ml), bovine liver S12 (1, 3, 5 mg prot/ml), and human hepatocytes (125,000 cells/ml). DHECM was diluted (30 µM DHEC, final concentration) in cold Sørensen buffer 0.1 M pH 7.4 containing the liver enzyme preparation, MgCl₂ (10 mM), glucose 6-phosphate (10 mM), NADP (0.5 mM), and glucose 6-phosphate dehydrogenase (1 U/ml) in a total volume of 500 µl. After incubation at 37°C for 30 min, reactions were terminated by adding diethyl ether (1:8, v/v) and vortex-mixing (30 s). The upper organic layers were separated and concentrated under a gentle N₂ stream.

Semi-preparative scale reactions were performed with bovine liver S12 (5 mg prot/ml) in a total volume of 500 ml (4 ×). The DHECM concentration and other reaction parameters were maintained as described above, except that incubations were performed at 120 rpm, for 24 h, and reactions were terminated by liquid-liquid extracting with diethyl ether (1:2, v/v, 3 ×). Upper organic layers were combined and concentrated in rotary evaporator (40°C).

2.6. Accurate Mass Measurement of DHEC Metabolites

The diethyl ether extracts of analytical scale reactions were diluted in 500 µl CH₃CN-H₂O (1:1). An aliquot (100 µl) of each reaction extract was analyzed on a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC consisted of LC-10AD and LC-

10Advp solvent pumps, SPD-10Avp UV-VIS detector, SCL-10Avp controller, and a Prevail C₁₈ column (150 x 4.6 mm I.D., 5 µm, Alltech) at a flow rate of 1 ml/min of the mobile phase gradient 20%B/1 min – 70%B, 15 min (A = H₂O-0.1% TFA; B = CH₃CN-0.1% TFA). Chromatographic peaks obtained were manually collected and analyzed using a quadrupole-TOF hybrid mass spectrometer Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, UK). Ionization of purified metabolites was performed with a nano Z spray source operating in positive ion mode; ionisation conditions used were: Capillary voltage 2.3 kV, cone voltage and RF1 Lens were 10 and 30 respectively and collision energy of 10eV. The source temperature used was 80°C, cone gas was N₂ at 80 l/h, and no nebulizer gas was used to obtain spray. Argon was used for collisional cooling or fragmentation of ions in the collision cell. External calibration with sodium iodide was performed over mass range from 50 to 1000 *m/z*. All spectra were acquired with the TOF analyser in “W-mode” (TOF kV=10.15) with the MCP voltage set at 2150 V in continuum mode, using MassLynx software (v3.5). The absolute mass measurements deviations, in parts per million (ppm), were calculated combining ten spectra of each analyte data. Elemental compositions of metabolites and parent drug were deduced using the “elemental composition” tool included in MassLynx. Tandem mass spectra of unknown metabolites were acquired in “V-mode” (TOF kV=9.10), without accurate mass measurement procedure.

2.7. Isolation of 8'-OH-DHEC

The crude diethyl ether extract of semi-preparative scale biotransformations was submitted to flash chromatography on silica gel 60 (230 – 400 mesh, Macherey-Nagel, Düren, Germany) column (15 x 2.5 cm) equilibrated with CH₂Cl₂. The sample was eluted with 200 ml CH₂Cl₂-MeOH (95:5) and 150 ml MeOH. The methanolic wash-out was evaporated to dryness and dissolved in CH₃CN-H₂O (1:1) for further work up on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) consisting of two LC-10Advp solvent pumps, a SPD-10Avp UV-VIS detector, a SCL-10Avp controller, and a Vydac reverse phase C₁₈ column (250 x 10 mm I.D., 5 µm, 300 Å, Grace) at a flow rate of 3 ml/min of the mobile phase gradient 20%B/1 min – 70%B, 30 min (A = H₂O-0.1% TFA; B = CH₃CN-0.1% TFA). The chromatographic peaks were collected and reinjected in a Prevail reverse phase C₁₈ column (150 x 4.6 mm I.D., 5 µm, 110 Å, Alltech) at a flow rate of 1 ml/min, using the same mobile phase and LC instrumentation described above. The chromatographic peaks of DHEC metabolites were collected and freeze dried in an Edwards Super Modulyo (Sussex, England) freeze dryer. The 8'-OH-DHEC was obtained as a white light powder.

2.8. NMR Analysis

NMR experiments were performed on a Varian Unity INOVA 700 MHz spectrometer. Chemical shifts were referred to the residual solvent signal (DMSO-*d*₆: δ_H = 2.50, δ_C = 39.0). Homonuclear (¹H-¹H) and heteronuclear (¹H-¹³C) connectivities were determined by COSY, TOCSY 1D, ROESY and HSQC experiments, respectively. Two- and three-bond ¹H-¹³C connectivities were determined by a HMBC experiment optimised for a ^{2,3}*J* of 10 Hz.

2.9. LC/MS/MS Instrumentation and Analytical Conditions

HPLC analysis were performed using a CTC Analytics HTSPal auto sampler (Switzerland), a Shimadzu LC-10ADvp solvent pump (Kyoto, Japan) and a Genesis reverse phase C₁₈ column (100 × 2.1 mm I.D., 4 μm, 110 Å, Jones Chromatography) at a flow rate of 0.35 ml/min of CH₃CN-H₂O (1:1, v/v)/0.1% acetic acid. The liquid chromatograph was interfaced with an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer via a Turboionspray ionization source (Applied Biosystems, Toronto, Canada). The mass spectrometer was operated in the positive ion detection mode with the ion spray voltage set at 5.5 kV. Nitrogen was used as curtain gas and auxiliary gas for nebulization. The source temperature was set at 450°C. The electrospray interface and mass spectrometer parameters were optimized to obtain maximum sensitivity at unit resolution. Quantitation was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions of m/z 612 → m/z 270.2 for DHEC, m/z 628 → m/z 270.4 for OH-DHEC, and m/z 656 → m/z 348.1 for the I.S. (bromocriptine) with a scan time of 0.2 s per transition. Argon was used as collision gas and the collision energy for each ion transition was optimized to produce the highest intensity of the selected ion peak. These were 41 eV for both DHEC and the I.S., and 47 eV for OH-DHEC. Data acquisition and peak integration were performed using Analyst 1.4 softwear (Applied Biosystems). Calibration curves were constructed by plotting peak area ratio (each analyte to the I.S.) against plasma concentration using a $1/x^2$ weighted linear regression. Concentrations of the analytes in quality control samples (QCs) or unknown samples were subsequently interpolated from these curves.

2.10. Calibration Standards and Quality Controls

Stock solutions of DHEC and OH-DHEC were prepared in methanol to give final concentrations of 1000 μg/ml (based on the free base form). A single DHEC/OH-DHEC was then prepared and serially diluted with CH₃CN-H₂O (1:1, v/v) to obtain the desired standard concentrations. The resulting working solutions were kept refrigerated (4°C). I.S. working solution (1 ng/ml) was prepared by diluting the 1000 μg/ml stock solution of bromocriptine with CH₃CN-H₂O (1:1, v/v). The standard solutions (100 μl) and I.S. (50 μl) were used to spike blank plasma samples (0.9 ml), either for calibration curves of both analytes or for QCs in the pre-study validation and during the pharmacokinetic study.

2.11. Sample Preparation

To a 0.5 ml aliquot of plasma sample, 50 μl of I.S. (1 ng/ml) and 4 ml of diethyl ether-hexane (8:2, v/v) were added. After vortex-mixing for 40 s, samples were frozen (-70°C) for 30 min. The upper organic layer was removed and evaporated to dryness at 40°C under a gentle N₂ stream. The residue was dissolved in 150 μl of CH₃CN-H₂O (7:3, v/v) and vortex-mixed for 15 s. A 40 μl aliquot of the resulting solution was injected into the LC/MS/MS system for analysis.

2.12. Method Validation

Preliminary experiments were done to evaluate the extraction efficiency (analyte recovery) of the method de-

scribed. The percentage of recovery was calculated as the ratio of the peak area for the extracted blank plasma spiked at each standard concentration (0.03, 0.15, 1.8 ng/ml, n = 6 for each concentration) relative to the peak area of the equivalent blank plasma samples spiked after the extraction. The calibration curves to define the relationship between analyte concentration and response were prepared by analyzing spiked plasma samples and defined in three runs based on triplicate assays. The limites of quantitation (LOQs) were defined taking into account the method sensitivity, precision and accuracy. To evaluate precision and accuracy, specific QC samples at three concentration levels (0.03, 0.15, 1.8 ng/ml) were included in the validation procedure. The intra- and inter-batch precision was determined as the relative standard deviation, $RSD(\%) = 100(SD/M)$, and the accuracy as the percentage relative error, $RE(\%) = (E-T)/(100/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M, E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration. For the determination of the specificity, blank plasma samples were tested for interference at the retention time of the drug, metabolite or internal standard using the proposed extraction procedure and LC/MS/MS conditions and compared with those obtained with an aqueous solution of the respective standards at a concentration near to the LOQs.

To test analyte stability, a series of human plasma samples containing DHEC and OH-DHEC at 0.03, 0.15, and 1.8 ng/ml were prepared from the same master solutions used for the QCs and LOQ samples. Each sample type (n = 5) was freshly processed and immediately quantified in order to provide *reference* values. To evaluate long-term (storage) stability, each sample type (n = 5) was frozen (-20°C), thawed, and then extracted and quantified after 16 days. To evaluate freeze-and-thaw stability, a freeze-and-thaw cycle was defined as the storage of each sample type at -20°C followed by thawing at room temperature, as follows: 1st cycle - 24h freeze; 2nd cycle - 12h freeze; 3rd cycle - 12 h freeze. Then samples were quantified after the third cycle. To evaluate short-term stability, each sample type (n = 5) was frozen, thawed, maintained at room temperature for 6 h and then analyzed. To evaluate post-processing stability, each sample type (n = 5) was maintained at the autosampler temperature (12°C) for 24 h.

2.13. Application to Pharmacokinetics

The LC/MS/MS method developed was used to investigate plasma profiles of DHEC and its major metabolite OH-DHEC after oral administration of 18 mg DHECM (12 × 1.5 mg tablet of Iskevert®, Eversil/Divicon Pharma) to twelve male healthy volunteers. Dosing commenced at approximately 07:00 h. The actual time of dosing was recorded using 24 hours clock notation. Blood was sampled from a cubital vein by venipuncture immediately before the administration (t₀) and then after 0:15h, 0:30h, 0:45h, 1h, 1:15h, 1:30h, 1:45h, 2h, 2:15h, 2:30h, 2:45h, 3h, 3:30h, 4h, 4:30h, 5h, 5:30h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 11h and 12h. Blood was sampled into heparine coated tubes and, after 30 min, centrifuged at 3,000g for 5 min at 18°C. The resulting plasma was transferred to glass tubes and submitted to liquid-liquid extraction as described in *sample preparation*. The following pharmacokinetic parameters were calculated: peak of concentration

(C_{max}), the area under the curve (AUC) of the plasma concentration until the last concentration observed (AUC_{last}), and the area under the curve between the first sample (pre-dosage) and infinity ($AUC_{0-\infty}$). The C_{max} and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained directly from the curves. The areas under the plasma concentration vs. time curves from time zero to the last detectable concentration (AUC_{last}) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was done by adding the value C_{last}/k_e to the calculated AUC_{last} (where C_{last} = the last detectable concentration). The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase in a log-linear plot, and the half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2)/k_e$). The protocol was approved by the local Ethics Committee.

3. RESULTS

3.1. DHECM Metabolites

For the metabolite profile study, DHECM (30 μ M) was incubated with rat liver microsomes (1 mg prot/ml), bovine liver microsomes (1 mg prot/ml), bovine liver S12 (1, 3, 5 mg prot/ml), and human hepatocytes (125.000 cells/ml). The analytical scale (500 μ l, 30 min, $n = 3$) screening showed that DHEC was converted into the more hydrophilic metabolites M1 and M2 with complete dependency on both NADPH and liver enzyme concentrations (Fig. 1). As the incubation time extended, the more hydrophilic metabolites M3 and M4 were additionally produced. These are depicted in Fig. (2), in the chromatogram typical of the diethyl ether extract of the bovine liver semi-preparative scale incubates (500 ml, 24 h, $n = 2$).

The accurate mass measurement of DHEC and its metabolites, together with their differences in mass and deduced elemental compositions are summarized in Table 1. The experimental m/z data observed generated no more than 3 possible elemental compositions when the mass error tolerance was set at 5 ppm and the elements C, H, O, N, and S were considered without limiting the number of each element.

Regarding possibilities, the metabolites M1 and M2, having a measured monoisotopic m/z of 628.3137 and 628.3130

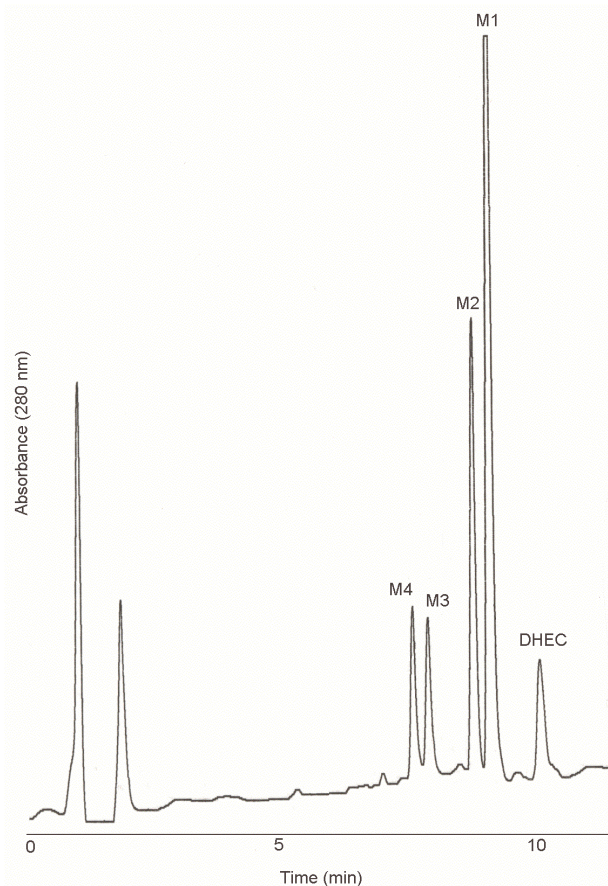


Fig. (2). HPLC chromatogram of the diethyl ether extract of 30 μ M DHEC semi-preparative incubation (500 ml) with bovine liver S12 (5 mg prot/ml) and NADPH regenerating system. For chromatographic condition see Materials and Methods.

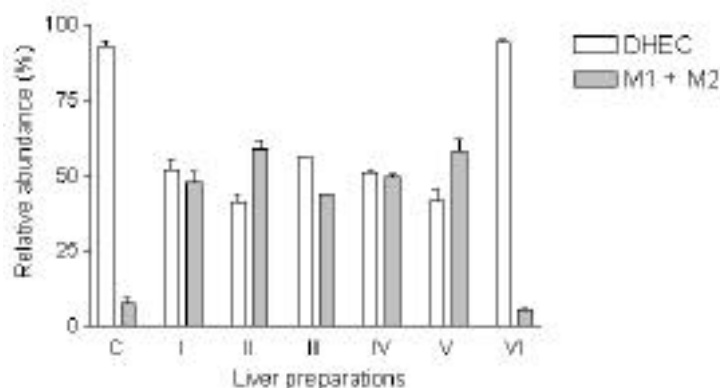


Fig. (1). Conversion of DHEC (30 μ M) to 8'-OH-DHEC (M1+M2) by different liver preparations after 1 h incubation (Sørensen buffer 0.1 M pH 7.4). C, control: bovine liver S12 + no NADPH regenerating system; I: rat liver microsome 1 mg prot/ml + NADPH regenerating system; II: bovine liver microsomes 1 mg prot/ml + NADPH regenerating system; III: bovine liver S12 1 mg prot/ml + NADPH regenerating system; IV: bovine liver S12 3 mg prot/ml + NADPH regenerating system; V: bovine liver S12 5 mg prot/ml + NADPH regenerating system; VI: human hepatocytes 125.000 cells/ml + no NADPH regenerating system.

Table 1. Exact Mass Measurements of Protonated DHEC and its Metabolites (M1-M4) Formed *In Vitro* by Bovine Liver S12

HPLC peak assignment ^a	Obs <i>m/z</i>	Δ mass (Da) M – DHEC	suggested elemental composition	Calcd <i>m/z</i>	Error (ppm)
DHEC	612.3196	-	C ₃₅ H ₄₂ N ₅ O ₅	612.3186	-1.6
M1	628.3130	15.9934	C ₃₅ H ₄₂ N ₅ O ₆	628.3135	0.8
M2	628.3137	15.9941	C ₃₅ H ₄₂ N ₅ O ₆	628.3135	-0.3
M3	644.3091	31.9895	C ₃₅ H ₄₂ N ₅ O ₇	644.3084	-1.1
M4	644.3095	31.9899	C ₃₅ H ₄₂ N ₅ O ₇	644.3084	-1.8

^aSee Figure 2. The theoretical mass of oxygen is 15.9949 Da.

respectively, were identified both as monooxygenated metabolites of DHEC (theoretical *m/z*, 612.3135). Similarly, the unknown metabolites with a measured monoisotopic *m/z* of 644.3091 (M3) and 644.3095 (M4) were both identified as dioxygenated metabolites of DHEC (theoretical mass, *m/z* 644.3084).

All tandem mass spectra of DHEC and its metabolites M1-M4 (Fig. 3) under positive electrospray ionization showed an intense signal of *m/z* 270, corresponding to the protonated dihydroisergamide, which structure is reported in Fig. (4). The presence of this fragment both in parent drug and metabolites indicates that biotransformation did not occur in this part of the DHEC molecule.

In order to characterize the major DHEC metabolite, we performed several NMR experiments on deuterio-DMSO solutions of DHECM and metabolites M1 and M2. As shown in Fig. (5), the spectroscopic data obtained from ¹H- and ¹³C-NMR and 2D NMR experiments (COSY, ROESY, HSQC and HMBC) clearly indicated that both M1 and M2 had the same core structure as DHEC, with differences limited to the presence in both metabolites of an additional hydroxyl group at C-8'. Furthermore, the NMR data showed that both M1 and M2 were a mixture of two epimers at C-8'. A detailed analysis of ¹H- and ¹³C-NMR spectra of DHECM and M1/M2, providing the assignment of all the proton and the carbon signals of the substructures A-C, allowed us to characterize the residual different molecular portion (C), as shown in Fig. 6, (the δ_H and δ_C values are depicted on formulas C, C1 and C2). Complete NMR data will be fully described elsewhere.

3.2. LC/MS/MS Assay Performance

The analytical method herein presented for pharmacokinetic purposes was developed regarding 8'-OH-DHEC as the major DHEC metabolite. DHECM and the *in vitro* produced 8'-OH-DHEC were first characterized by MS and MS/MS by flow injection analysis to ascertain their precursor ions and to select product ions for use in MRM. The full-scan Q1 mass spectrum of DHEC and 8'-OH-DHEC in the positive-ion mode showed the protonated molecular ions [M+H]⁺ as major ion peaks. The product ion spectra of [M+H]⁺ showed the predominant ions at *m/z* 350.2, 270.2, and 168.2 for DHEC and at *m/z* 350.4, 270.4 and 168.4 for 8'-OH-DHEC.

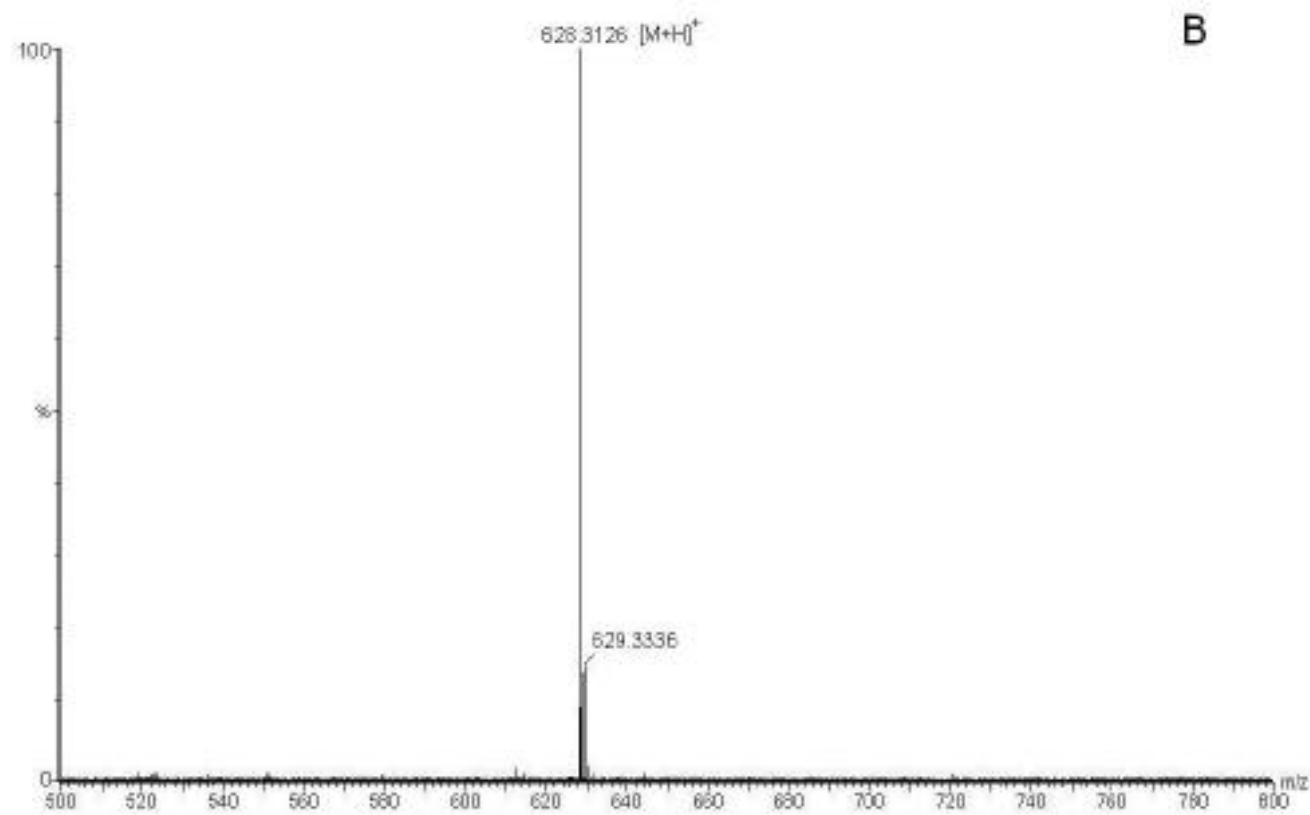
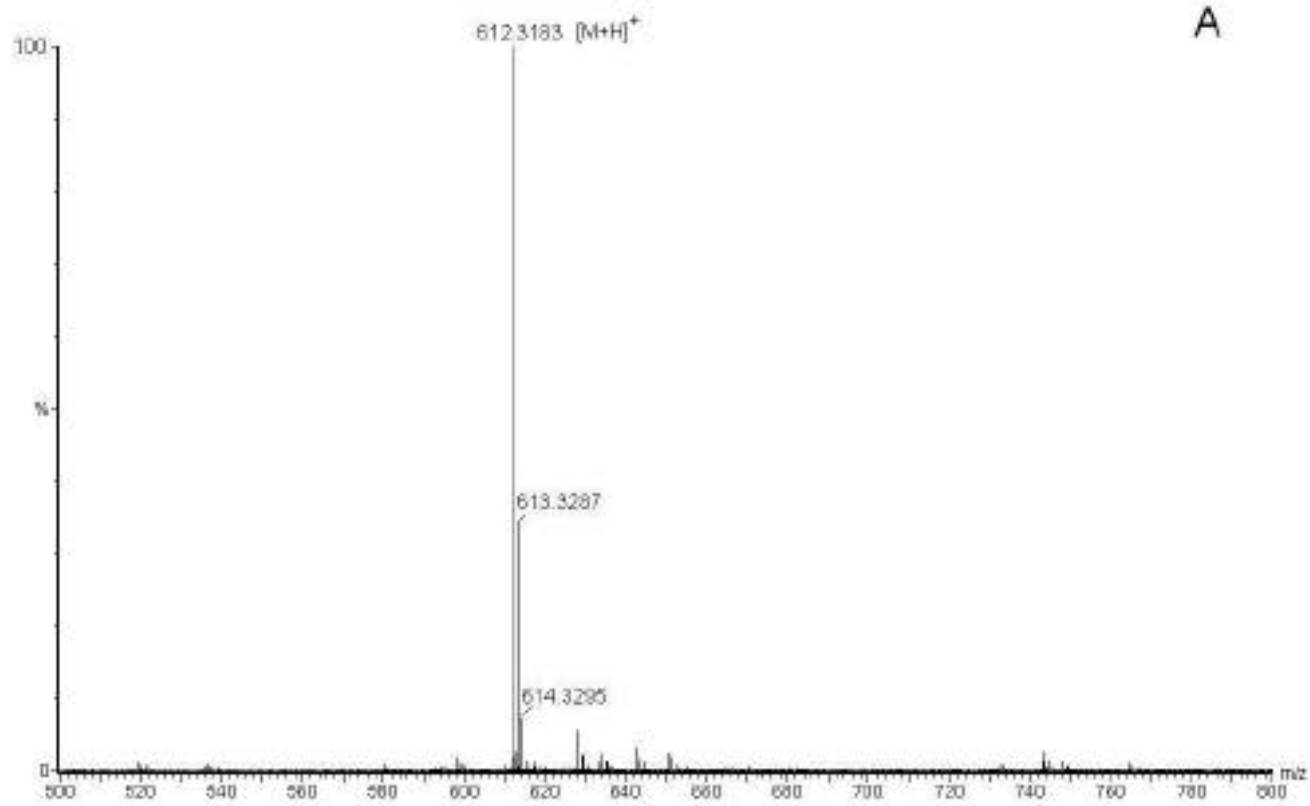
Due to highest intensity the fragment ion at *m/z* 270 was chosen for the MRM acquisition of both analytes. Therefore, the most suitable collision energy was determined by observing the maximum response obtained for *m/z* 270. Using similar procedures, the precursor ion of the I.S. was determined to be the base peak [M+H]⁺ ion at *m/z* 656, and MRM transition of *m/z* 656→341.1 was selected for acquisition.

The optimized method was validated on extraction recovery, linearity, quantification limit, precision and accuracy. Coefficients of variation and relative errors of less than 15% were considered acceptable, except for the LOQs, for which the values were extended to 20%, as recommended by Shah *et al.*[14] and Bressole *et al.*[15] for pharmacokinetic studies using biological samples. The recoveries of DHEC, 8'-OH-DHEC and I.S. from plasma at the concentration levels of 0.03, 0.15, and 1.8 ng/ml (n = 15 for each concentration) were, respectively, 54%, 59% and 60% for DHEC, 64%, 59% and 59% for 8'-OH-DHEC, and 61%, 60% and 54% for I.S. The method was linear for DHEC and 8'-OH-DHEC concentrations from 0.01 to 2 ng/ml ($r^2 > 0.9990$) on repeated calibration curves, using linear regression with $1/x^2$ weight. The LOQs validated under the condition found during the pre-study validation were of 0.01 ng/ml for DHEC and 0.02 ng/ml for 8'-OH-DHEC. Inter- and intra-run accuracy and precision for the QCs are summarized in Table 2.

Regarding stability, DHEC and 8'-OH-DHEC were found to be stable in human plasma after three cycles of freeze-thaw, 6 h at room temperature, and after 16 days under -20°C (Table 3).

3.3. Plasma concentrations of DHEC and 8'-OH-DHEC

The average plasma concentrations of DHEC and 8'-OH-DHEC after the administration of tablets are shown in Fig. (7), and the statistics of the principal pharmacokinetic variables are shown in Table 4. The peak of DHEC of 0.28 $\mu\text{g/l}$ was reached 0.46 h after administration, and the peak of 8'-OH-DHEC of 5.63 $\mu\text{g/l}$ was 1.04 h following administration. The plasma concentrations of DHEC and 8'-OH-DHEC differed tremendously, with the AUC for the metabolite being about 30 times higher than that for the parent compound. The $t_{1/2}$ for DHEC and 8'-OH-DHEC were 3.5 h and 3.9 h, respectively.



(Fig. 3) contd....

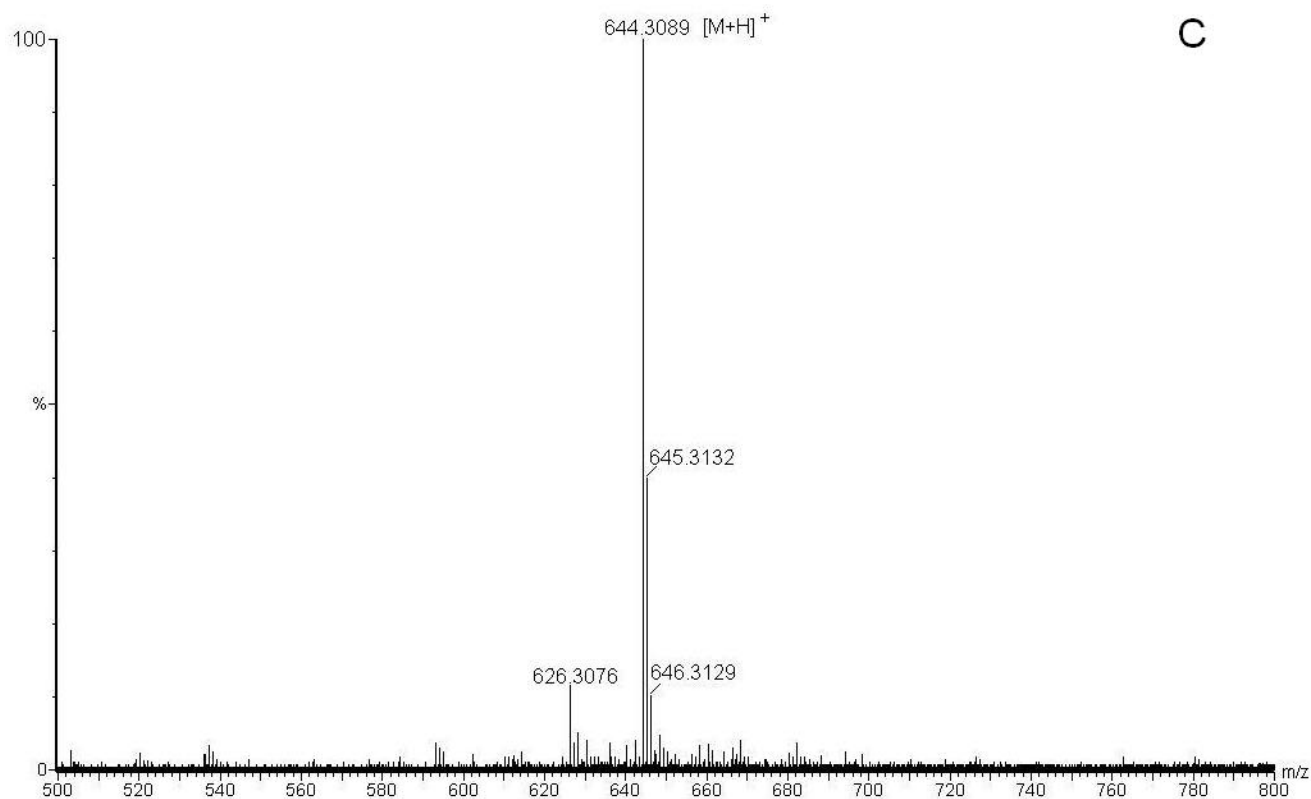


Fig. (3). Typical TOF MS/MS spectra of protonated (A) DHEC, m/z 612 and DHEC metabolites (B) M1, M2, m/z 628 and (C) M3, M4, m/z 644, formed *in vitro* by liver preparations. See Materials and Methods for experimental conditions.

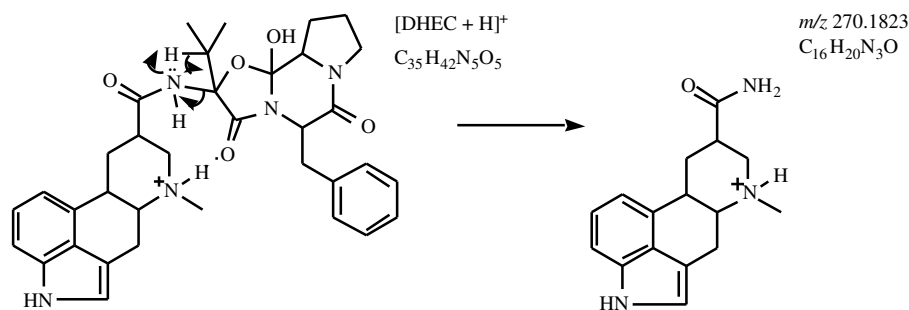


Fig. (4). Proposed mechanism pathway for product ion m/z 270 formation through mass fragmentation of protonated DHEC and metabolites M1-M4 ($[M+H]^+$).

4. DISCUSSION

Our study was design to show the utility of metabolite analyses in pharmacokinetic investigations of drugs subjected to high first-pass metabolism. As shown in Fig. (7), this is the case of DHECM for which clinical dosing leads to circulating concentrations of parent drug below 0.3 $\mu\text{g/l}$. Our approach required production and isolation of major DHEC metabolites for the development of a LC/MS/MS analytical method.

The conversion of DHEC into the more hydrophilic metabolites M1-M4 (Fig. 2) followed the *in vitro* hepatic metabolism pattern previously observed for ergotamine [16]. Presently, most of the analytical work associated with characterization of metabolites of a drug is carried out by mass spectrometry by observing mass shifts relative to the parent drug [17-19]. In our study, a time of flight mass spectrometer was used to determine accurate masses and elemental composition differences between unknown metabolites and the

otherwise well-characterized DHEC. The predicted empirical formulae of $C_{35}H_{42}N_5O_6$ for both (protonated) metabolites

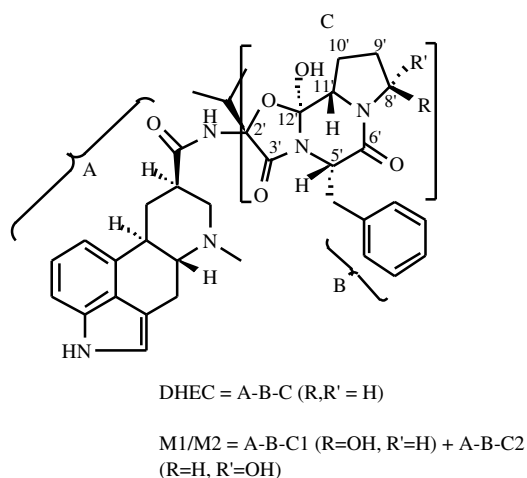


Fig. (5). Substructures A, B, and C of DHEC and derivatives.

M1 and M2 and of $C_{35}H_{42}N_5O_7$ for both (protonated) M3 and M4 (Table 1) indicated that 2 monooxygenated (OH-DHEC) and 2 dioxygenated [(OH)₂-DHEC] DHEC derivatives were produced. Although little is known about DHEC metabolism, our tandem mass fragmentation data (Fig. 3 and 4) indicated that oxygen atoms were inserted in the amino acid derived portion of the molecule. It could be expected, based on previous studies on biotransformation of bromocriptine [20] and dihydroergotamine [21-22], that hydroxylations occurred in the proline moiety of the molecule. Regardless the liver preparation tested (Fig. 1), screening for DHEC metabolites gave two OH-DHEC isomers (M1+M2) as major biotransformation products (Table 1).

Relative to DHEC, the striking differences in the ¹H-NMR spectra were the resonances of the segment C-8'/C-11' (Fig. 6), as well as the presence in the ¹H-NMR spectra of metabolites M1 and M2 of two additional D₂O-exchangeable signals at δ 5.94 and 6.00. COSY and 1D TOCSY spectra (¹H-¹H correlations) of M1 and M2 were useful to assign the proton resonances of the segment C-8'/C-11' for the two hydroxylated derivatives. The information arising from

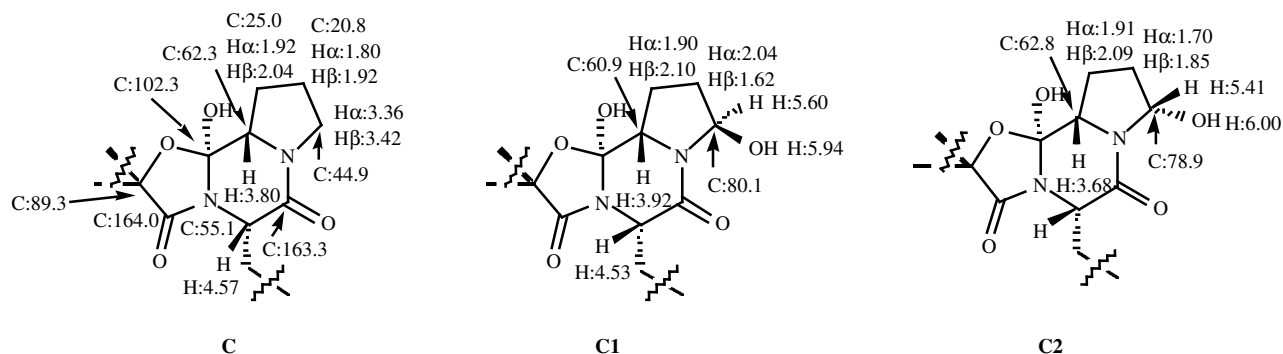


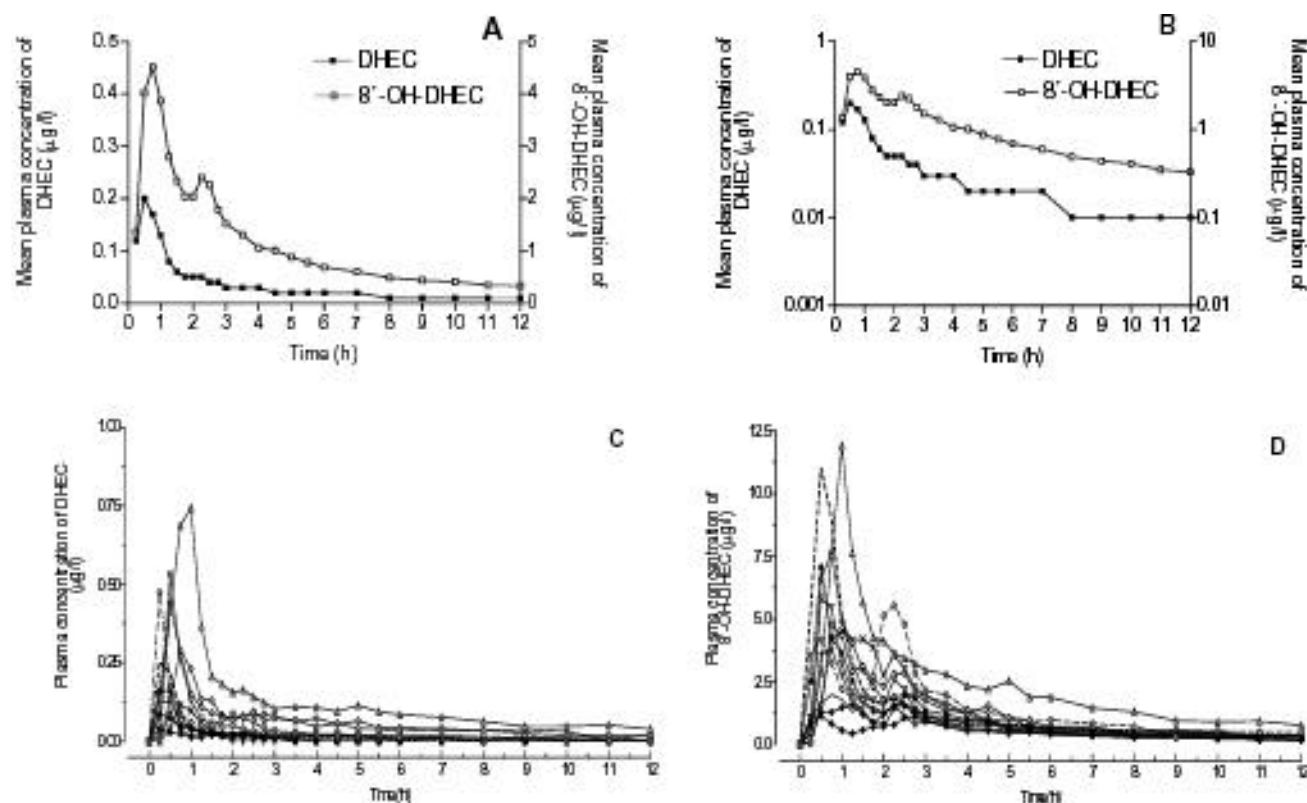
Fig. (6). Partial ¹H and ¹³C NMR data (DMSO-d₆) from DHEC (C) and OH-DHEC metabolites M1 and M2 (C1/C2).

Table 2. Summary of Precision and Accuracy from QCs of Human Plasma Extracts

Parameter	Nominal concentration (ng/ml)							
	DHEC				8'-OH-DHEC			
	0.01	0.03	0.15	1.8	0.02	0.03	0.15	1.8
Intra-batch								
Mean found (ng/ml, n = 8)	0.01	0.03	0.14	1.81	0.02	0.03	0.14	1.73
Accuracy (%)	100.5	93.0	95.0	100.4	96.6	102.6	96.0	96.3
Precision (%)	11.9	6.0	6.2	6.5	17.4	11.0	7.4	4.8
Inter-batch								
Mean found (ng/ml, n = 3)	0.01	0.03	0.14	1.79	0.02	0.03	0.14	1.73
Accuracy (%)	99.2	93.8	95.1	99.7	107.3	100.0	93.1	95.9
Precision (%)	14.7	9.1	6.2	5.4	16.2	14.6	10.0	6.5

Table 3. Stability of DHEC and 8'-OH-DHEC in Human Plasma (n = 5)

	DHEC (ng/ml)			8'-OH-DHEC (ng/ml)		
	0.03	0.15	1.8	0.03	0.15	1.8
Storage stability (-20°C, relative error, %)						
16 days	19.3	12.0	9.3	23.5	7.0	6.2
Freeze-thaw stability (relative error, %)						
3 cycles	14.7	10.7	8.5	0.1	12.9	17.8
Post-processing stability (12°C, relative error, %)						
24 h	-3.7	3.0	-1.2	-0.1	3.1	4.2
Short-term stability (room temperature, relative error, %)						
6 h	9.9	-9.5	-3.6	19.7	-3.6	-6.3

**Fig. (7).** Plasma concentration vs. time of DHEC and 8'-OH-DHEC after oral administration of DHECM 18 mg tablets: A, mean data (n = 12) on linear plot; B, mean data (n = 12) on semilog plot; C, individual (n = 12) DHEC plasma concentration vs. time profile, and D, individual (n = 12) 8'-OH-DHEC plasma concentration vs. time profile.

HSQC (^1H - ^{13}C correlations *via* 1J) and HMBC (^1H - ^{13}C correlations *via* $^{2,3}J$) spectra of M1 and M2 confirmed the location of the hydroxylation at C-8', permitting to assign the sequences C-5'/C12' as reported on formulas C1 and C2 (Fig. 6). A key ROESY correlation (^1H - ^1H dipolar coupling) between the OH resonating at δ 5.94 and the proton linked at C5' (δ 4.53, β -oriented) allowed us to assign the sub-

structure C1 for the epimeric 8'-R-hydroxy-derivative. On the basis of all NMR data we find that both M1 and M2 were a mixture of (8'R)- and (8'S)-8'-OH-DHEC. As the present approach does not contemplate stereochemistry, the analytical method presented was developed using the mixture of epimeric 8'-OH-DHEC as reference material.

Table 4. Pharmacokinetic Parameters of DHECM

Variable	Averages and CV (%)	
	DHEC	8'-OH-DHEC
C _{max} (µg/l)	0.28 (78.7)	5.63 (59.3)
t _{max} (h)	0.46 (56.2)	1.04 (63.8)
k _e	0.38 (88.8)	0.19 (30.7)
t _{1/2} (h)	3.50 (64.8)	3.90 (27.5)
AUC _{0-last} (µg/l.h)	0.39 (105.7)	13.36 (43.6)
AUC _{0-∞} (µg/l.h)	0.48 (102.6)	15.22 (45.1)

Previous pharmacokinetic data on DHEC were obtained using RIA [23] which although good in sensibility, presents the drawback of cross-reactions between parent drug and metabolites. The present report is the first describing a method for the simultaneous determination of DHEC and OH-DHEC in human plasma using LC/MS/MS with electrospray ionization source in positive mode. The fragment ion of m/z 270, which is also formed by dihydroergotamine and 8'-OH-dihydroergotamine under electrospray ionization [5], was chosen for the MRM acquisition of both DHEC and 8'-OH-DHEC. LOQs of 10 pg/ml (DHEC) and 20 pg/ml (8'-OH-DHEC) were proven sufficient for pharmacokinetic studies after oral intake of DHECM in therapeutic doses, and results of assay performance (Table 2) indicated that it is precise and accurate enough for the routine determination of DHEC and its major metabolite 8'-OH-DHEC in human plasma.

Following administration of 18 mg DHECM tablets, the peak (0.28 µg/l) of DHEC occurred after 0.46 ± 0.26 h and of 8'-OH-DHEC (5.63 µg/l) after 1.04 ± 0.66 h (Table 4). By previously using RIA, the C_{max} for DHEC was determined as approx. 0.62 µg/l (t_{max} of 0.69 ± 0.05 h) after administration of 6 mg DHECM tablets [23]. The bioavailability of DHECM in terms of AUC_{0-∞} was 15.70 µg/l.h, when determined by LC/MS/MS as the sum of DHEC and 8'-OH-DHEC plasma concentrations, and 3.94 µg/l.h when calculated by RIA [23]. Naturally these values can not be directly compared, as the analytical tools, dosing regimes, and tablet formulations were distinct. On the basis of DHECM mg administered the data herein presented and those previously determined by RIA are of the same order of magnitude; the mean peaks of DHEC (plus metabolite) were 0.32 µg/l (t_{ax} 0.08 h) and 0.10 µg/l (t_{max} 0.11 h), respectively, and the bioavailability (AUC_{0-∞}) of DHECM was 0.87 µg/l.h when determined by LC/MS/MS and 0.65 µg/l.h when determined by RIA.

On the basis of t_{max}, the results in Table 4 are in agreement with those described for the simultaneous determination of dihydroergotamine and 8'-OH-dihydroergotamine in human plasma by LC/MS/MS after administration of 20 mg dihydroergotamine tablets to male volunteers [5]. Regarding C_{max}, the peak of 0.28 µg/l for DHEC is also in agreement with that of about 0.20 µg/l for dihydroergotamine, indicating these alkaloids undergo similar processes of absorption and distribution. However, regarding metabolites, the C_{max}

found for 8'-OH-DHEC (5.63 µg/l) is about 6 times that one reported for 8'-OH-dihydroergotamine (~0.90 µg/l). Therefore, at the biotransformation level these alkaloids might present some enzyme affinity differences. Certainly, this interesting fact will be better understood in a near future, as knowledge on ergot alkaloid metabolites progresses.

The apparent plasma DHEC t_{1/2} determined by LC/MS/MS (3.5 h) agreed with those previously determined by RIA for DHEC [23] and dihydroergotamine [4, 24] after oral administration of corresponding tablets. Regarding data on 8'-OH-DHEC, it is worth emphasizing that the calculated plasma t_{1/2} (3.9 h) did not follow dosing with metabolite, since it is the parent compound which is used in therapeutics. However, for pharmacodynamic reasons it is interesting to know about elimination of metabolites, specially in the case of ergot alkaloids, where the literature indicates that the hydroxy-metabolites cooperate with the overall parent biological activity [25,26].

5. CONCLUSION

The *in vitro* metabolism reactions are a valuable tool for providing non-commercially available and not easily synthesized reference material for the development of analytical methods. By using highly accurate spectrometric resources nowadays available, such as ESI-TOF and NMR, little sample was required (about 1 mg) for fully structural characterization of 8'-OH-DHEC. Regarding this approach, a LC/MS/MS method for the simultaneous determination of DHEC and its major metabolite 8'-OH-DHEC was successfully developed, demonstrating that pharmacokinetic data for oral forms of DHEC are more suitably accessed from metabolite analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. John Salmon for constructive comments on *in vitro* metabolism experiments.

REFERENCES

- Olin, J.; Schneider, L.; Novit, A. and Luczak, S. (2001) *Cochrane Database Syst Rev.*, **2**, CD000359.
- Roman, G. (2000) *Drugs Today* **36**, 641-653.
- Serino, A.; Kan, K.; Graves, K.; Kule, C. and Anthony, A. (2000) *Life Sci.* **67**, 1489-1505.
- Setnikar, I.; Schmid, K.; Rovati, L.C.; Vans-Cappell, B.; Mazur, D. and Kozak, I. (2001) *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **51**, 2-6.
- Chen, X.; Zhong, D.; Xu, H.; Schug, B. and Blume, H. (2002) *J Chromatogr. B* **768**, 267-275.
- Rowell, P.P. and Larson, B.T. (1999) *J. Anim. Sci.* **77**, 1800-1806.
- Peyronneau, M.-A.; Delaforge, M.; Riviere, R.; Renaud, J.-P. and Mansuy, D. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 947-956.
- Tvrdeic, A. and Pericic, D. (2003) *Coll. Antropol.* **27**, 175-182.
- Puras, G.; Santafe, J.; Segarra, J.; Garrido, M. and Melena, J. (2002) *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **240**, 322-328.
- Korneyev, A.Y. and Cincotta, A.H. (1996) *Life Sci.* **58**, 241-248.
- Scarzella, L.; Bono, G. and Bergamasco, B. (1992) *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **12**, 37-46.
- Milvio, C. (1992) *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **42**, 1399-1402.
- Davies, E.M. (1988) *An. Biotech. Lab.* 27-38.
- Shah, V.P.; Midha, K.K.; Dighe, S.; McGilverly, I.J.; Skelly, J.P.; Yacobi, A.; Layoff, T.; Viswanathan, C.T.; Cook, C.E.; McDowall, R.D. and Pitman, K.A. (1992) *Spectrosc. Pharm. Res.* **9**, 588.
- Bressole, F.; Petit, M.B. and Audran, M. (1996) *J. Chromatogr. B* **686**, 3.
- Moubarak, A.S. and Rosenkrans Jr, C.F. (2000) *Biochem Biophys Res. Comm.* **274**, 746-749.

- [17] Zhang, H. and Henion, J. (2000) *Anal. Chem.* **72**, 3342-3348.
- [18] Anari, M.R.; Bakhtiar, R.; Franklin, R.B.; Pearson, P.G. and Baille, T.A. (2003) *Anal. Chem.* **75**, 469-478.
- [19] Anari, M.R.; Sanches, R.I.; Bakhtiar, R.; Franklin, R.B. and Baille, T.A. (2004) *Anal. Chem.* **76**, 823-832.
- [20] Maurer, G.; Schreier, E.; Delaborde, S.; Loosli, H.R.; Nufer, R. and Shukla, A.P. (1982) *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.* **7**, 281-292.
- [21] Maurer, G. and Frick, W. (1984) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **26**, 463-470.
- [22] Delaforge, M.; Rivière, R.; Sartori, E.; Doignon, J-L. and Gronet, J-M. (1989) *Xenobiotica* **19**, 1285-1295.
- [23] Coppi, G.; Zanotti, A. and Mailland, F. (1992) *Arzneimittelforschung* **42**, 1397-1399.
- [24] Wadworth, A.N. and Chrisp, P.(1992) *Drug Aging* **2**, 153-173.
- [25] Valente, D.; Delaforge, M.; Urien, S.; Guivarc'h, D.; Vienet, R.; Grognet, J.M. and Ezan, E. (1997) *J Pharmacol Exp Ther.* **282**, 1418-1424.
- [26] Hanoun, N.; Saurini, F.; Lanfumey, L.; Hamon, M. and Bourgoïn, S. (2003) *Br J Pharmacol.* **139**, 424-434.

4-DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O presente estudo descreve a importância da caracterização farmacocinética na análise de drogas que sofrem extenso metabolismo de primeira passagem. Porém, para a condução de tal análise, diferentes processos foram experimentados a fim de validar técnicas *in vitro* e analíticas para a produção de metabólitos e sua identificação em amostras de plasma humano, respectivamente.

Devido as diferentes etapas deste trabalho, foi possível estabelecer 3 distintos momentos de resultados que puderam ser analisados e trabalhados. O primeiro momento descreve o estudo do metabolismo da DHEC por técnica *in vitro*.

Durante o desenvolvimento de uma droga, pesquisas farmacocinéticas e toxicológicas podem fazer uso de várias técnicas *in vivo* para a obtenção de dados referentes a esta etapa. Contudo, há sempre uma preocupação se a exposição da droga à animais irá refletir o seu comportamento em humanos. Desse modo, estudos de metabolização *in vitro* (que utilizam modelos de metabolismo humano) podem elucidar os possíveis dados omitidos em outros modelos de pesquisa (Wrighton, 1995; Anari, 2004). Este tipo de técnica tem adquirido grande importância na caracterização de novas moléculas durante o desenvolvimento e estudo de novas drogas (Zhang, 2000).

Hepatócitos, microssomas hepáticos e seus derivados são muito usados na predição de metabolismo de drogas *in vivo* com uma notável vantagem de um processo mais simples e, muitas vezes, de menor custo do que estudos realizado em animais (Hewitt, 2001).

Estudos *in vitro* podem ser divididos em duas grandes categorias: sistema celulares, que inclui suspensão de hepatócitos, cultura de células e linhas derivadas de hepatócitos; e preparações de enzimas metabolizadoras, que caracterizam-se por frações sub-celulares (microssomas e porções cistólicas) e preparações de enzimas isoladas (Wrighton, 1995).

O processo de metabolismo da DHEC apresentado neste trabalho envolveu o uso da categoria de frações sub-celulares de processos *in vitro*, conforme citado acima.

Com a proposta de produção em larga escala do metabólito da DHEC, fez-se necessário a comparação de diferentes meios de metabolismo *in vitro*, inclusive do método de sistema celular (hepatócitos) para que o resultado com melhor rendimento fosse escolhido. Deve-se notar que, o método deveria suprir a necessidade de produção para a caracterização da molécula química por meio de Q-TOF e RMN; e viabilidade na otimização de tempo e custo.

Desse modo, optou-se pela escolha comparativa entre microsossoma de rato e de boi, fração pré-microsossomal de fígado de boi (S12) – em diferentes concentrações – e hepatócito humano.

Os melhores resultados demonstraram uma similaridade entre o uso de microsossoma de boi e S12 bovino em concentração de 5mg prot/mL. Devido a técnica para preparação de S12 ter se apresentado de maneira, relativamente, mais simples e com um consumo menor de tempo, foi padronizado o uso deste meio para a metabolização da DHEC.

A atividade enzimática de frações sub-celulares em preparações *in vitro* para a metabolização de drogas tem sido demonstrada em outros de estudos (Wrighton, 1995). No presente estudo, como propósito do uso desta técnica foi mimetizar o efeito de primeira passagem, as frações microsossomais e derivados tornam-se o método mais indicado para a reprodução de reações de fase I (Hewitt, 2001).

A preparação das amostras de S12 seguiu a técnica descrita por Hewitt *et al.*, 2002; onde apenas a última etapa de centrifugação foi emitida para que fosse utilizada a fração pré-microsossomal. A omissão desta etapa proporcionou a redução no tempo de preparação dos meios e a utilização de menos reagentes.

Um estudo realizado com outro alcalóide do Ergot – Ergotamina – corrobora os resultados encontrados na produção dos metabólitos da DHEC. Moubarak e Rosenkrans, 2000; relataram a formação de quatro metabólitos derivados da Ergotamina após a utilização de técnica *in vitro* com microsossoma hepático de boi. Esta técnica elucidou a

relação dependente da formação de metabólitos com a concentração de proteínas do meio.

A reação de formação de metabólitos descrita com a DHEC no atual estudo também estabeleceu uma relação de dependência com a concentração de proteínas no meio (1mg prot/mL; 3mg prot/mL e 5mg prot/mL). Dentro do tempo estipulado de 24h de reação, o meio de 5mg prot/mL teve maior capacidade de biotransformação a droga-mãe em metabólitos.

Apesar de não realizado com células hepáticas de boi, o trabalho de Mas-Chimberlin *et al.*, 1997; também demonstrou a formação de metabólitos após o uso de técnicas *in vitro* na metabolização do alcalóide do ergot diidro-alfa-ergocriptina. Em cultura de hepatócitos humanos e microsoma humano, de rato e de macaco foram observados até 8 metabólitos diferentes a partir da biotransformação da droga-mãe.

Para tanto, o propósito de produção dos metabólitos derivados da DHEC foi alcançado com sucesso através do uso de S12 de boi em concentração de 5mg prot/mL por técnica *in vitro*.

O segundo momento do estudo envolveu a técnica analítica para a observação, identificação e caracterização dos metabólitos produzidos na etapa anterior.

De maneira freqüente, tem-se abordado a importância do uso de métodos analíticos, como a espectrometria de massa, na caracterização de moléculas ainda não conhecidas (Zhang, 2000; Anari, 2004; Tiller, 2008). Desse modo, é notória a necessidade do desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos analíticos para uma seletiva e sensível identificação de metabólitos a partir de matrizes biológicas (Anari, 2004).

Dentro das últimas duas décadas, os avanços tecnológicos no meio analítico conduziram a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (LC-MS/MS) a uma metodologia alternativa de escolha para identificação estrutural de moléculas, como metabólitos de drogas biotransformadas (Tiller, 2008).

Neste contexto, o LC-MS/MS oferece vantagens significativas sobre os outros sistemas de resolução mais lentos, onde os íons dos metabólitos de interesse são mais facilmente diferenciados da matriz biológica. O uso de LC-MS/MS também permite a identificação dos metabólitos com muito mais confiabilidade através do embasamento da composição elementar da droga precursora e seus fragmentos de íons (Tiller, 2008).

Seguindo a técnica mencionada, o presente estudo demonstrou a identificação dos metabólitos da DHEC, após biotransformação pela fração pré-microsomal S12 de boi, pelo uso de LC-MS/MS em matrizes biológicas relativamente simples (Tiller, 2008).

Para aumentar a exatidão do método na análise dos metabólitos, um espectro da droga precursora foi registrado em condições de alta resolução com o objetivo de possibilitar a diferenciação da massa da droga-mãe de seus metabólitos. Tal técnica possibilita a confirmação de hipóteses sobre a formação elementar das moléculas pela análise da massa dos íons observados (Tiller, 2008).

A seletividade diferenciada no uso de LC-MS/MS para a identificação de metabólitos da DHEC apresentada neste trabalho pode ser comprovada quando comparada com a caracterização analítica da mesma droga por radioimunoensaio (RIA) (Coppi, 1992; Chen, 2002).

Através do método de RIA foi possível descrever parâmetros farmacocinéticos da DHEC, como C_{max} , t_{max} e $ASC_{0-\infty}$; porém sendo detectado apenas um único composto (droga-mãe). Possivelmente, neste método, os metabólitos da DHEC foram mensurados junto a droga-mãe, não sendo identificados após a biotransformação em voluntários sadios (Coppi, 1992).

A confirmação da caracterização molecular dos metabólitos observados pela espectrometria de massa descrita neste trabalho veio por meio do uso do *Quadrupole Time-of-Flight* (Q-TOF) para que houvesse uma definição de massa mais precisa e uma elaboração adequada da estrutura elementar dos fragmentos (Anari, 2004; Ren, 2008). Pelo fato da massa dos metabólitos ser elevada (acima de 500 Da), fez-se necessária uma elevada exatidão do sistema para diminuir as possibilidades de composições moleculares

relacionadas aos metabólitos. E, com o objetivo de aumentar a precisão na identificação estrutural da molécula, as massas dos metabólitos avaliadas no Q-TOF tiveram uma tolerância máxima de erro de 5ppm (Zhang, 2000).

Com embasamento em estudos anteriores que demonstram a formação de metabólitos hidroxilados a partir de diferentes alcalóides do Ergot (Moubarak, 2000; Chen, 2002; Valente, 1997); evidências sugeriram a adição de uma hidroxila nos metabólitos M1 e M2 formados pela DHEC. A diferença da massa dos íons encontrados para a droga-mãe DHEC foi, aproximadamente, o peso molecular de um Oxigênio, cuja massa teórica exata é de 15,9949 Da (Zhang, 2000).

A confirmação desses dados se deram com a análise das moléculas por Ressonância Magnética (RMN) que identificou a inserção da hidroxila no C-8' da porção derivada de aminoácido da molécula. E, pelo fato de M1 e M2 possuírem massas semelhantes, a hipótese de se tratar de epímeros também foi confirmada. Os dados de Chen et al., 2002; corroboram esta avaliação, onde é descrito a inserção de hidroxilas nos metabólitos derivados da diidroergotamina nas posições 8' α - e 8' β -.

Como também ocorreu a observação de outros 2 diferentes metabólitos M3 e M4 de semelhantes massas, discute-se a hipótese dos mesmos serem a conversão dos metabólitos M1 e M2 após uma nova hidroxilação.

Os dados do estudo com a Ergotamina (Moubarak, 2000), novamente, conduzem a suposição de adição de mais uma hidroxila na molécula após uma nova exposição dos metabólitos a enzima metabolizadora, o que pode ocasionar a formação dos metabólitos M3 e M4. Tal hipótese é sustentada pelo fato da massa de ambos os metabólitos ter sido acrescida em mais 16 Da, aproximadamente. A confirmação das massas de M3 e M4 com 32 Da a mais no peso molecular quando comparados a droga-mãe, o perfil de retenção após análise em LC-UV similar aos metabólitos dihidroxilados da DHE e sua produção em menores concentrações, levam a conclusões de que também trata-se da dihidroxilação da DHEC após um tempo maior de exposição da droga às enzimas do meio de metabolização.

Estudos com a Bromocriptina sugerem, inclusive, que os metabólitos diidroxilados possuem uma certa atividade farmacológica sobre o organismo (Valente, 1997). Tal fato não foi considerado neste estudo devido experimentos de atividade farmacológicas relacionadas aos metabólitos não terem sido realizados.

As técnicas para análise dos dados descritos no presente estudo teve, seguiu desde o princípio, normas preconizadas por órgãos regulatórios para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos métodos e assim assegurar a validação da metodologia utilizada.

Entidades como FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos; ANVISA no Brasil e EMEA (*European Medicine Agency*) exigem a comprovação dos processos analíticos metodológicos em relação a especificidade, seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, exatidão e robustez (Brasil, 2003; FDA, 2001; EMEA, 2008).

Em relação a recuperação da DHEC e seu metabólito, o teste contemplou a faixa de linearidade do método através da análise dos valores extraídos em baixa, média e alta concentração (0,03; 0,15 e 1,8mg/mL; respectivamente).

Comparando a recuperação do padrão interno e da DHEC houve uma diferença média de 0,7% entre as concentrações recuperadas. Quanto ao metabólito 8'-OH-DHEC, a diferença média foi de 2,3%. Tendo como base o estudo da DHE (Chen, 2002), que também realizou a recuperação tanto da droga-mãe quanto do metabólito monohidroxilado (8'-OH-DHE), a diferença média em comparação com o padrão interno usado no estudo citado foi de 20% e 26%, respectivamente. Percebe-se, nesse caso, uma notável eficácia no método de recuperação da DHEC e 8'-OH-DHEC apresentado no presente estudo, visto que é recomendado pelas regulamentações nacionais e internacionais que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutível quando comparada ao padrão interno (Brasil, 2003; FDA, 2001).

De acordo com a ANVISA e o FDA, bem como seguindo a recomendação de alguns autores da literatura científica internacional (Shah, 1992; Bressole, 1996), a precisão e exatidão descritos na análise da DHEC e seu metabólito obedeceram o

coeficiente de variação e erro relativo preconizados para a validação de uma metodologia analítica. Os resultados mostraram um erro relativo menor que 20% para o limite inferior quantificado e um valor menor a 15% para as demais concentrações durante as análises intra- e inter-corrída dos controles de qualidade.

Em relação a estabilidade da amostra, os testes realizados demonstraram que tanto a DHEC quanto seu metabólito 8'-OH-DHEC foram estáveis nas avaliações de armazenamento a longo e curto prazo, na avaliação de congelamento-descongelamento e pós-processamento.

O terceiro e último momento do estudo envolve a análise dos parâmetros farmacocinéticos encontrados para a DHEC e 8'-OH-DHEC, tanto quanto as possíveis implicações na prática clínica dos recentes valores avaliados para esta droga.

Devido não existir dados anteriores sobre o perfil farmacocinético da DHEC e seu metabólito, os valores encontrados neste estudo não podem ser diretamente comparados a qualquer outro existente na literatura. Porém, algumas ponderações se fazem importantes em relação a outros trabalhos científicos existentes.

A avaliação dos valores farmacocinéticos da DHEC e 8'-OH-DHEC com os mesmos parâmetros citados da DHE e seu metabólito (Chen, 2002) mostra-se como um importante dado a ser considerado. Por se tratar de regimes semelhantes e ambos administrados a voluntários sadios (18mg para DHEC e 20mg para DHE), a relação do perfil farmacocinético das duas drogas pode ser associada.

O pico de concentração da DHEC foi de 0,28µg/mL; enquanto para DHE foi, aproximadamente, de 0,20µg/mL. Isso pode refletir processos similares de absorção e distribuição de ambas as drogas, visto a semelhança das doses administradas.

Contudo, a mesma inferência não pode ser feita em relação aos metabólitos das respectivas drogas. Primeiramente, a concentração do 8'-OH-DHEC foi cerca de 6 vezes maior (5,63µg/mL) do que a encontrada para o metabólito 8'-OH-DHE (0,90µg/mL). Por último, a relação do valor C_{max} entre o metabólito e a droga-mãe foi 20 vezes

maior para 8'-OH-DHEC e apenas 4,5 vezes para o metabólito da DHE. Este fato leva a suposição de diferentes afinidades dos metabólitos às enzimas biotransformadoras, o que certamente poderá ser melhor estudado em estudos futuros.

Conforme citado anteriormente, os parâmetros farmacocinéticos da DHEC já foram descritos anteriormente, em 1992 por Coppi *et al.*; pela técnica de radioimunoensaio. É importante salientar, novamente, que a dose administrada a voluntários sadios foi de 6mg. Neste estudo, utilizou-se uma reação *in vivo* da DHEC com um ligante radioisótopo para gerar um composto detectável na forma inalterada; enquanto no presente trabalho a DHEC foi analisada após uma técnica *in vitro*.

Apesar das diferenças, ambos estudos dosaram a droga-mãe no sangue de voluntários sadios, com coletas em tempos previamente definidos. Desse modo, os parâmetros C_{max} , t_{max} e $ASC_{0-\infty}$ tornam-se comparáveis.

Os valores observados da DHE foram C_{max} de $0,62\mu\text{g/mL}$ com um t_{max} de $0,69 \pm 0,5\text{h}$ e uma $ASC_{0-\infty}$ de $3,94\mu\text{g/L.h}$. A comparação direta com os dados da DHEC mostram valores muito superiores no estudo atual. Porém, considerando os regimes de dose administrados, esses valores apresentam-se superiores devido a dose de DHEC no presente estudo ter sido 3 vezes maior do que no estudo feito por RIA, o que torna inviável a comparação entre os dados.

Com o objetivo de transformar os dados comparáveis diretamente, os valores obtidos no método de LC-MS/MS foram divididos por 3 para que, supostamente, a dose administrada fosse considerada também em 6mg (e não 18mg como foi realizado), igualando-se a mesma ordem de regime do método de RIA.

Mesmo assumindo esta nova proporção, diferenças significantes entre os parâmetros farmacocinéticos citados acima continuaram sendo observadas, onde os valores das concentrações do método de LC-MS/MS foram superiores aos valores do método de RIA.

Algumas hipóteses podem ser consideradas. Como primeira suposição, admite-se que a concentração da droga absorvida, distribuída e metabolizada foi superior nos

voluntários submetidos ao método de LC-MS/MS quando comparados com àqueles participantes do estudo de RIA. Tal fato pode ter ocorrido por diferença na formulação dos comprimidos administrados, visto que a forma farmacêutica foi a mesma.

A segunda hipótese relaciona-se com a metodologia utilizada nas técnicas comparadas: ambas demonstraram sensibilidade similares, porém a seletividade do método de LC-MS/MS foi superior. Esta afirmação pode ser fundamentada no fato da observação e identificação do metabólito 8'-OH-DHEC que não foi observado em RIA. Assim, pressupõe-se que entre a droga dosada no método de RIA também se encontravam os metabólitos visualizados neste estudo que, porém, não tiveram suas massas identificadas de maneira separada.

Dentro deste contexto, é possível supor que parte do efeito farmacológico da DHEC pode ser associado ao seu metabólito 8'-OH-DHEC, visto que a concentração da droga-mãe é 20 vezes inferior e é eliminada mais rapidamente que seu metabólito do organismo. Avaliando que o metabólito circula no sangue em maiores concentrações e que permanece mais tempo no organismo, possibilitando assim sua interação com receptores, a hipótese de ser um agente ativo no efeito terapêutico é viável.

As avaliações dos efeitos farmacológicos do metabólito da DHE sobre os receptores 5-HT_{1A} em cérebro de rato (Hanouin, 2003) e dos metabólitos mono e dihidroxilado da bromocriptina na inibição da prolactina *in vitro* (Valente, 1997), corroboram os dados do presente estudo.

A formação de metabólitos a partir da biotransformação da DHEC não havia sido caracterizada até a realização da presente técnica de LC-MS/MS. Este fato conduz a proposição que o esquema terapêutico desta droga tenha sido baseado em dados farmacocinéticos anteriores, os quais mostraram-se não concordantes com a descrição atual.

Dessa maneira, assume-se que o regime de dose usado em pacientes sob tratamento de DHEC pode, na verdade, refletir concentrações mais elevadas do que a

esperada. No caso de uso em pacientes idosos, a escolha da dose é essencial para que, riscos associados a idade avançada, não provoquem malefícios no paciente.

Estudos científicos demonstram que o volume e fluxo hepático estão reduzidos de 25% a 30% em pessoas idosas (LeCouteur, 1998) e enzimas pertencentes ao citocromo P450 são sintetizadas em menor proporção com o envelhecimento do organismo (Sotaniemi, 1997; Jansen, 2002).

Sabendo-se que os dados presentes na bulas de medicamentos – como nos medicamentos que contem DHEC – supostamente são utilizados na prática clínica, a concentração descrita sobre a DHEC é inferior do que a observada nesta pesquisa. Em uma situação de metabolismo alterado, as modificações na droga e em seus metabólitos podem não ser previsíveis já que a tomada de decisão estará embasada em valores que não traduzem a realidade farmacocinética da droga, o que aumenta a possibilidade de efeitos indesejáveis ou tóxicos. No caso de redução na biotransformação da droga, por uma menor atividade hepática, poderá ocorrer um acúmulo da DHEC no organismo e um retardo na formação do metabólito 8'-OH-DHEC, que podem afetar o C_{max} e o t_{max} e, conseqüentemente, em seu efeito farmacológico.

Uma depreciação na função renal também é associada a idade avançada de indivíduos. A partir da sétima década de vida, a maioria das pessoas tem de 30% a 50% da função glomerular perdida. E, aos 80 anos de vida, pode haver uma perda de 10% a 15% no volume total de água do corpo (Ginsberg, 2005; Wynne, 2005; Messina, 2004).

A partir do momento em que a DHEC é indicada para patologias de tratamento crônico, as condições citadas acima podem ocasionar um aumento da contração da droga no sangue, gerando um efeito acumulativo (visto que sua eliminação está prejudicada). Em um esquema terapêutico de doses múltiplas e com uma eliminação mais lenta, ambos DHEC e 8'-OH-DHEC podem ultrapassar o índice terapêutico e evoluir para efeitos tóxicos, ocasionando riscos a saúde do paciente.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A técnica *in vitro* mostrou-se como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de métodos analíticos que requeiram análises de metabólitos formados após o efeito de primeira passagem.

O uso associado das técnicas LC-MS/MS e Q-TOF foram capazes de elucidar quimicamente o principal metabólito da DHEC, como técnicas de suporte na caracterização da molécula química, confirmada posteriormente por RMN.

A metodologia utilizada de LC-MS/MS pode ser considerada validada por sua sensibilidade, seletividade e robustez na descrição do perfil farmacocinético da DHEC e 8'-OH-DHEC a partir de amostras de plasma de voluntários sadios.

Apesar de não ter sido caracterizado o índice terapêutico da DHEC até o presente momento, nota-se a importância dos dados obtidos neste estudo – por meio de LC-MS/MS – para uma reavaliação do esquema terapêutico, um possível monitoramento farmacocinético e a reformulação dos dados publicados sobre a droga, tendo como objetivo um tratamento cada vez mais seguro na prática médica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B; Johnson, A; Peter, W; et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4^a. ed. Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 2004, 549.

Anari, MR; Bakhtiar, R; Franklin, RB; Pearson, PG; Baillie, TA. Study of fragmentation mechanism of protonated 6-hydroxychlorozoxazone: application in simultaneous analysis of CYP2E1 activity with major human cytochrome P450s. *Analytical Chemistry*. 2003; 75(3): 469-478.

Anari, MR; Sanchez, RI; Bakhtiar, R; Franklin, RB; Baillie, TA. Integration of knowledge-based metabolic predictions with liquid chromatography data-dependent tandem mass spectrometry for drug metabolite studies: application to studies on the biotransformation of Indinavir. *Analytical Chemistry*. 2004; 76(3): 823-832.

Ansel, HC; Popovich, NG; Allen, LV. *Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6^a. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000, 568p.

Audi, G. The History of Nuclidic Masses and of their Evaluation. *Int J of Mass Spect.* 2006, 251(2-3): 85-94.

Bandoh JK. Clinical experience with dihydroergocristine-reserpine-clopanamide combination in Ghanaian hypertensives (Abstract). *Ghana Med* 1973; 12(2):166-176.

Boulanger, B; Chiap, W; Crommen, J; Hubert, PH. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003; 32: 753-765.

Braggio, S; Barnaby, RJ; Cugola, M. A strategy for validation bioanalytical methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1996; 14: 375-388.

Brasil, Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002. Manual de boas práticas em biodisponibilidade bioequivalência/agência nacional de vigilância sanitária. Gerência-geral de inspeção e controle de medicamentos e produtos.

Brasil, Brasília, DF. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, 02 de junho de 2003.

Bressole, F; Bromet-Petit, M; Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B*. 1996; 686: 3-10.

Bronzini A, Michetti A, Barbieri R. The treatment of acute cerebrovascular accidents with the association of dihydroergocornine, dihydroergocristine and dihydroergocryptine with novocaine (Abstract). *Clin Ter* 1967; Jun30;41(6):515-522.

Buick, AR; Doig, MV; Jeal, SC; Land, GS; McDowall, RD. Method Validation in the Bioanalytical Laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1990; 8(8-12): 629-637.

Burtis, AC; Munk, MN; McDonald, FR. Rapid Separation of the Components of Nucleic Acids and Urine by High-Resolution Liquid Chromatography. *Clinical Chemistry*. 1970; 6(8): 667-676.

Calisti G, Biscarini L, Misesa A. Controlled clinical study of use of dihydroergocristine in cerebral and peripheral vascular disorders (Abstract). *Clin Ter* 1977; 83(4):371-386.

Carvalho, HF, Pimentel, SMR. A célula. São Paulo: Ed. Manole, 2001, 297p.

Castelli PM, Sironi G. Dihydroergocristine in the treatment of Raynaud's Disease (Abstract). *Minerva Cardioangiol* 1977; 25(9):757-763.

Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*. 1997; 689: 175-180.

Chen, X; Zhong, D; Xu, H; Schug, B; Blume, H. Sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for dihydroergotamine and its major metabolite in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2002; 768: 267-275.

Cole, RB; Cole, GE. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications. Wiley-interscience. 1997, 600p.

Collins, CH; Braga, GL; Bonato, PS. Introdução a Métodos Cromatográficos. 7^a ed. Campinas, SP. Editora UNICAMP. 1997.

Coppi G, Zanotti A, Mailland F. Pharmacokinetic Studies of Dihydroergocristine in Volunteers Following Oral Administration of Three Formulations. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1992; 42(II):1397-1399 – a.

Coppi, G. Dihydroergocristine. A review of pharmacology and toxicology. *Arzneimittelforschung*. 1992 Nov;42(11A):1381-90 – b.

Costa, AB; Cooks, RG. Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Phy Letters*. 2008; 464(1-3): 1-8.

Dadgar, D; Burnett, PA. **Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1995; 14: 23-31.

Dadgar, D; Burnett, PA; Choc, MG; Gallicano, K; Hooper, JW. Application issues in biological method validation, sample analysis and data reporting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995; 13: 89-97.

Dole, M; Mack, LL; Hine, RL; Mobley, RC; Ferguson, LD; Alice, MB. Molecular Beams of Maroions. *J Chem Phys*. 1968, 49: 2240-2249.

Drago, F; Valerio, C; Scalisi, B; D'Agata, V; Scapagnini, U. Dihydroergocristine and memory alterations of aged male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988 Aug;30(4):961-5.

Eadie, MJ. Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? *Lancet Neurol*. 2004; 2(7):429-434.

EMEA. Concept Paper/Recommendations on the Need for a (CHMP) Guideline on the Validation of Bioanalytical Methods. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency, Londres 18 de Dezembro de 2008.

FDA. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May 2001.

Fenn, JB; Mann, M; Meng, CK; Wong, SF; Whitehouse, CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989, 246: 64-71.

Freis, ED; Stanton, JR; Litter, J; James, W; Haplerin, MH; Moister, FC; Wilkins, RW. The Hemodynamic Effects of Hypotensive Drugs in Man. II. Dihydroergocornine. *J Clin Invest*. 1949; 28:1387-1402.

Ginsberg G, Hattis D, Russ A, Sonawane B. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Factors That Can Affect Sensitivity to Neurotoxic Sequelae in Elderly Individuals. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113(9):1243-1249.

Hanoun, N; Saurinim, F; Lanfumey, L; Hamon, M; Bourgoin, S. Dihydroergotamine and its major metabolite, 8'-hydroxy-dihydroergotamine, as 5-HT_{1A} receptor agonists in the rat brain. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 139: 424-434.

Hartmann, C; Smeyers-Verbeke, J; Massart, DL; McDowall, RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1998; 17: 193-218.

Henoin, D. The Origins of Ion Spray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [article in press]. *Clin Chem*. 2009, Apr 9.

Hepler, C. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care, *Am. J. Pharm.* 1989; 53:7S-15S.

Hewitt, NJ; Bühring, KL; Dasenbrock, J; Haunschild, J; Ladstetter, B; Utesch, D. Studies comparing In Vivo:In Vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog,

monkey, and human using criopreserved hepatocytes, mocrosomes, and collagen gel immobilized hepatocyte. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001; 29: 1042-1050.

Holcapek, M; Kolarova, L; Nobilis, N. High-performance Liquid Chromatography tandem-mass spectrometry in the identification and determination of phase I and II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 391:59–78

Holtzman, E; Novikoff, AB. Células e Estrutura Celular. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1985.

de Hoon, JN. Poppe, KA; Thijssen, HH; Struijker-Boudier, HA; Van Bortel, LM. Dihydroergotamine: discrepancy between arterial, arteriolar and pharmacokinetic data. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Jul;52(1):45-51.

ISKEMIL[®], Monografia. Aché Laboratórios Ltda.

Jansen PL. Liver disease in the elderly. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16(1):149-158.

Kimanani, EK. Bioanalytical calibration curves: proposal for statistical criteria. *Journal of pharmacological and biomedical analysis*. 1998; 16: 1117-1124.

Klein K.. Effect of raubasine and dihydroergocristine on arteriosclerotic and hypertensive cerebral diseases. *Vasa* 1973; 2(4):109-414.

Lange, KW. Clinical Pharmacology of Dopamine Agonists in Parkinson's Disease. *Drugs & Aging*. 1998; 13:385-386.

LeCouteur DG, McLean AJ. The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* 1998 ; 34:359-373.

Leite, F. Validação em análise química. 4 ed. Campinas, Átomo. 2002, 1068p.

Maldom, Z. The Origin of Drugs in Current Use: The Ergot Alkaloids Story. 2002.. Acesso em: 17 jul 2005. Disponível em: <http://www.pearson-college.uwc.ca/pearson/fungi/ergot.htm>.

Martinetti L, Lai G. On several anti-hypertensive drugs with special reference to the association of dihydroergocristine, reserpine and clopamide (Abstract). *Arch Maragliano Patol Clin* 1970; 26(3):209-218.

Martins, IL. Determinação do Acetato de Magestrol em Plasma Humano Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS-MS). 121 páginas. Monografia – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Messina S, Battino D, Croci D, Mamoli D, Ratti S, Perucca E. Phenobarbital pharmacokinetics in old age: a case-matched evaluation based on therapeutic drug monitoring data. *Epilepsia* 2004; 46(3):372-377.

Milvio C. Dihydroergocristine in the Treatment of Organic Brain Syndrome – Dose-finding study against placebo. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1992; 42(II):1399-1402.

Moracchini PV, Alfano G, Melandri F. Treatment of peripheral vascular diseases with dihydroergocristine. *Minerva Cargioangiol* 1978; 26(4):277-290.

Moubarak, AS; Rosenkrans, CF. Hepatic metabolism of ergot alkaloids in beef cattle by cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274(3): 746-749.

Nelson, KA. The cancer anorexia-cachexia syndrome. *Seminars in Oncology.* 2000, 27(1):64-68.

Niessen, WMA. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 3^a Ed. Marcel Dekker Inc., New York. 2006, 630p.

PE Sciex[®] LC/MS – Mass Spectrometer API 3000 [monograph on CD-ROM]. 2004.

Reichmann H, Bilsing A, Ehret R, Greulich W, Schulz JB, Schwartz A, Rascol O. Ergoline and non-ergoline derivatives in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2006 Aug;253 Suppl 4:IV36-8.

Ren, L; Bi, K; Gong, P; Cheng, W; Song, Z. Characterization of the in vivo and in vitro metabolic profile of PAC-1 using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008; 876: 47-53.

Robertis, EDP, Robertis Junior, EMF. Bases da Biologia Celular e Molecular. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1993.

Roquebert J., Malek A., Gomond P. & Demichel P. (1984). Effect of dihydroergocristine on blood pressure and activity at peripheral α -adrenoceptors in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1984; 97, 21-27.

Salem,II; Idrees, J; Al Tamimi, JI. Determination of loratadine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; 34: 141-151.

Schiff, PL. Ergot and Its Alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*. 2006; 70(5) Article 98.

Shah, VP; Midha, KK; Dighe, S; McGilvery, IJ; Skelly, JP; Yacoby, A; Layoff, T; *et al.* Analytical Methods Validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Spector Pharm Res*. 1992; 9: 588-592.

Shah, VP; Midha, KK; Findlay, JWA; Hill, HM; Hulse, JD; McGilveray, IJ; Mckay, G; *et al.* Bioanalytical method validation – A revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*. 2000; 17: 1551–1557.

Silberstein, SD; McCrory, DC. Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache*. 2003 Feb;43(2):144-66.

Silverstein, RM; Webster, FX; Kiemle, DJ. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7^a ed. Rio de Janeiro. Ed. LTC. 2000, 506p.

Siuzdak, G. The expanding role of mass spectrometry in biotechnology. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*. 2004, 15.

Siuzdak, G.; Hollenbeck, T.; Bothner, B. Preparative Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *Journal of Mass Spectrometry*. 1999, 34: 1087-1088.

Siuzdak, G. Mass Spectrometry for Biotechnology. 1^a ed. San Diego, Academic Press. 1996, 162p.

Smith, LP; Parkins, WE; Forrester, AT. On the Separation of Isotopes in Quantity by Electromagnetic Means. *Phys Rev*. 1947, 72: 989-1002.

Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M. Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin Pharmacol Ther* 1997 ; 61:331-339.

Swanson, CP, Webster, PL. A Célula. 5a. ed. Rio de Janeiro: Ed. Prentice Hall do Brasil, 1988, 148p.

Szam I, Solyom I, Fischer J. Treatment of hypertension using a combination of clopamide, dihydroergocristine and reserpine. Clinico-pharmacological studies using biometric evaluation (Abstract). *Med Monatsschr* 1970; 24(1):28-34.

Tfelt-Hansen, PC; Koehler, PJ. History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*. 2008 Aug;28(8):877-86.

Tiller, PR; Yu, S; Castro-Perez, J; Fillgrove, KL; Baillie, TA. High-throughput, accurate mass liquid chromatography / tandem mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight system as a 'first-line' approach for metabolite identification studies. *Rapid Commun. Mass Specrom*.2008; 22: 1053-1061.

Thompson, F; Muir, A; Stirton, J; Macphee, G; Hudson, S. Parkinson's Disease. *The Pharmaceutical Journal*. 2001; 267:600-612.

Tognoni, G; Laporte, JR. Estudos de utilização de medicamentos e de farmacovigilância. In:(J.R. Laporte; G. Tognoni; S. Rozenfeld, (Org.).Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: Hucitec/Abrasco, 1989. p.43-56.

Valente, D; Delaforge, M; Urien, S; Guivarc'h, D; Vienet, R; Grognet, JM; Ezan, E. Metabolite involvement in Bromocriptine-induced prolactin inhibition in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997; 282: 1418-1424.

Van Dongen, PW; Groot, NA. History of ergot alkaloids from ergotism to ergotamine. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995, 60(2):109-116.

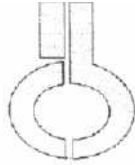
Wrighton, SA; Ring, BJ; Branden, MV. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicol Pathol*. 1995; 23: 199-208.

Wynne H. Drug Metabolism and Ageing. *J Br Menopause Soc* 2005; 11(2):51-56.

Zhang, H; Henion, J. Application of atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid Chromatography for the characterization of in vitro drug metabolites. *Analytical Chemistry*. 2000; 72(14): 3342-3348.

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11)3091 7733 - telefax : (55) (11) 3091. 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 04 de agosto de 2004.

PARECER 587 /CEP

Prezado Professor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quadragésima sétima reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Estudo de Biodisponibilidade Relativa de três Formulações de Diidroergocristina em Voluntários Sadios do Sexo Masculino, Diidroergocristina da Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, cápsulas de 6mg(Teste-1) versus Diidroergocristina (Iskevert) da Medley S.A, comprimidos de 1,5mg (Teste-2) versus a Diidroergocristina (Iskemil®) cápsula de 6mg, produzido pela Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A*".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto fo **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referid projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Cordialmente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. **GILBERTO DE NUCCI**
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Equipamento Utilizado para Análise da DHEC e 8'-OH-DHEC.

1-Material utilizado para processamento das amostras

Apparatus	Manufacturer, Country
Adjustables Pippetes (P200, P1000 and P10000)	Gilson, France
Disposable plastic pipettes tips - Labtip Yellow (range 5 - 200 μ L) & Labtip Blue (range 200 - 1000 μ L)	Gilson, France
Disposable Glass test tubes 120 x 12 mm	Laborglass, Brazil
Eppendorf repeating pipette	Eppendorf, USA
Plastic tubes 50 and 15 mL capacity	Costar, Brazil
Autosampler glass vials and caps	OCP Diagnostics, Brazil
Vortex mixer	Fischer, USA
Analytical balance	Ohaus, Germany

2- Equipamento utilizado para análise das amostras

Component	Manufacturer, Country	Model
Liquid Chromatograph	Shimadzu, Japan	LC-10AD VP
Auto sampler	CTC Analytics, Switzerland	HTSPal
Mass Spectrometer	Applied Biosystems, Canada	API 4000
Source	Applied Biosystems, Canada	Turboionspray
Data system	Applied Biosystems, Canada	Analyst v 1.4

Características do Método Analítico

1- Condições Cromatográficas

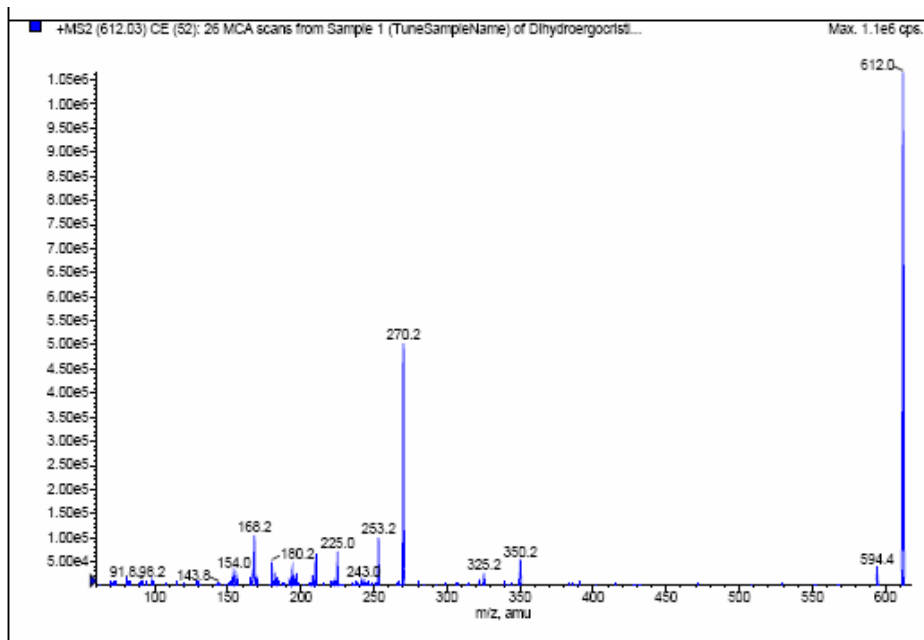
Parameters	Description
Mobile Phase	Acetonitrile/Water (50/50, V/V) and 0.1% of acetic acid
Analytical column	Jones Chromatography, Genesis, C18, 4 μ m (100 x 2.1 mm i.d.)
Guard column	Not used
Autosampler temperature	8 °C
Flow rate	0.35 mL/ min
Back pressure	120 bar
Column temperature	room temperature
Split	Not used
Injection volume	40 μ L
Total run time	3.0 min

2- Tempo de Retenção da DHEC, 8'-OH-DHEC e Bromocriptina

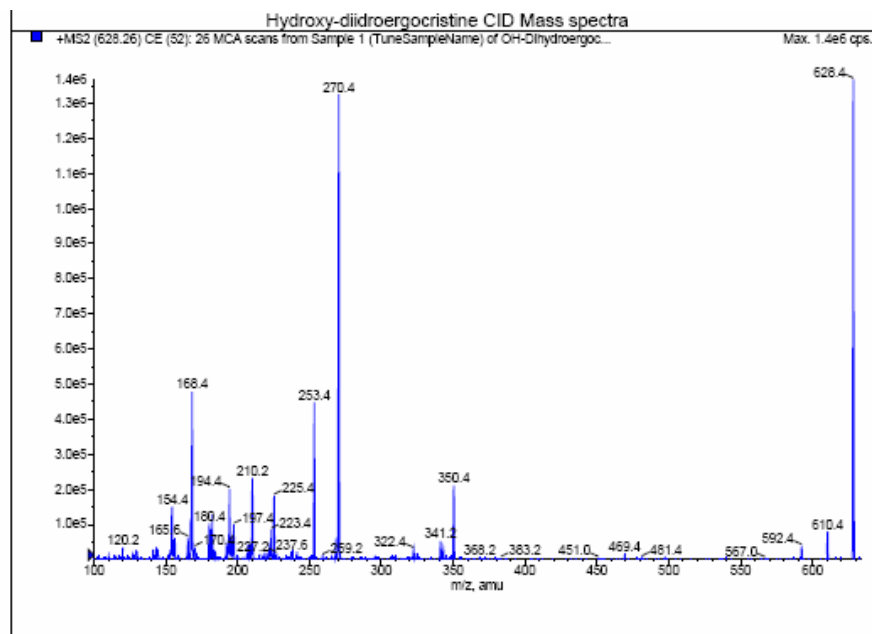
Standard retention times		Retention Time (min)
Dihydroergocristine	612.0 > 270.2	1.0 \pm 0.1
Hydroxy-dihydroergocristine	628.0 > 270.4	0.9 \pm 0.1
Bromocriptine	656.0 > 348.1	1.0 \pm 0.1

Espectro de Massa do Analito e Padrão Interno

1- Espectro de massa da DHEC



2- Espectro de Massa do 8'-OH-DHEC



3- Espectro de massa da Bromocriptina

