



Determinação de Ácido Micofenólico em Plasma por Cromatografia líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Marina V. ANTUNES¹, Cássio PARIS¹, Karoline O. THIELE¹, Elizete KEITEL²,
Valter D. GARCIA² & Rafael LINDEN^{1*}

¹ Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, n. 2755,
CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brasil

² Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre,
Rua Prof. Annes Dias, n. 295, CEP 90020-090, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO. O ácido micofenólico (AMF) é um fármaco imunossupressor amplamente utilizado em transplantes renais. O monitoramento terapêutico de AMF é recomendado para melhorar os resultados clínicos e reduzir os efeitos adversos. Foi desenvolvido um método para determinação de AMF em plasma por CLAE empregando fase móvel composta de tampão fosfato pH 2,3 e acetonitrila (50:50, v/v) e coluna C8 (250 x 4,0 mm) após uma etapa simples de precipitação de proteínas com acetonitrila. A curva de calibração ($y = 0,1515x - 0,0067$) apresentou linearidade adequada com $r^2 = 0,9999$. A exatidão (95-102%), precisão intra-ensaios (2,57-8,25%) e a precisão inter-ensaios (5,13-8,58%) foram aceitáveis. O limite de quantificação foi 0,1 µg/mL. O método foi aplicado na estimativa da AUC_{0-12} em 3 pacientes transplantados renais usando uma abordagem de amostragem limitada. A maioria das medidas apresentou valores abaixo das faixas terapêuticas recomendadas.

SUMMARY. "Determination of mycophenolic acid in plasma by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)". Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive drug widely used on kidney transplantation. MPA therapeutic drug monitoring is recommended to improve therapeutic outcomes and reduce adverse effects. The aim of this study was to validate a method for the determination of MPA in plasma, employing HPLC-DAD, after a simple protein precipitation step with acetonitrile. The calibration curve ($y = 0.1515x - 0.0067$) presented good linearity with $r^2 = 0.9999$. Accuracy (95-102%), intra-assay precision (2.57-8.25%) and inter-assay precision (5.13-8.58%) were acceptable. The quantification limit was 0.1 µg/mL. The method was applied to the estimation of AUC_{0-12} in 3 kidney transplant patients using a limited sampling approach. The majority of the measurements presented values below the recommended therapeutic ranges.

INTRODUÇÃO

O micofenolato mofetil (MMF) é um fármaco amplamente utilizado na terapia imunossupressiva de manutenção em pacientes transplantados renais¹. O MMF, administrado por via oral, é um pró-fármaco que é rapidamente metabolizado *in vivo* para seu constituinte ativo, ácido micofenólico (AMF, Fig. 1), através de esterases intestinais, plasmáticas e hepáticas². O principal produto do metabolismo do AMF é o seu glicuronídeo (GAMF), que não é ativo mas que pode estar presente no plasma em concentrações até 300 vezes superiores ao AMF¹. A atividade imunossupressora do AMF é devida à inibição re-

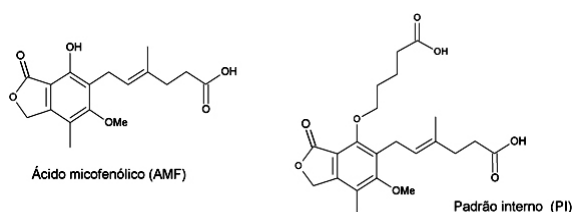


Figura 1. Estruturas químicas do ácido micofenólico e do padrão interno.

versível da inosina monofosfato desidrogenase, enzima necessária para a mitose dos linfócitos, o que resulta na redução da proliferação linfocitária^{1,2}.

PALAVRAS-CHAVE: Abordagem de amostragem limitada, Ácido micofenólico, CLAE-DAD, Modelo farmacocinético baiano.

KEY WORDS: Bayesian pharmacokinetic model, HPLC-DAD, Limited sampling approach, Mycophenolic acid.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: rafael.linden@feevale.br

Estudos recentes tem recomendado o monitoramento terapêutico de AMF em pacientes em farmacoterapia com MMF, especialmente devido à variabilidade inter-pacientes na exposição ao fármaco e à variabilidade intra-paciente ao longo da terapia ^{1,3-4}.

Em um estudo clínico com a utilização de MMF controlada pela concentração de AMF em plasma, van Gelder *et al.* ³, confirmaram que o risco de rejeição aguda é maior em pacientes com baixa exposição ao AMF e que a interrupção do tratamento devido a efeitos adversos é mais freqüente em elevadas exposições ao AMF. A exposição ao AMF é usualmente avaliada através da área sob a curva no intervalo de 0 a 12 h após a administração oral (ASC_{0-12}), com alvos consensuais recomendados entre 30 e 60 mg.h/L ⁴. Entretanto, a determinação da ASC_{0-12} representa um desafio prático, devido à necessidade de múltiplas coletas de sangue e ao longo tempo necessário para sua execução. Uma alternativa é o emprego de estratégias de amostragem limitadas, as quais permitem a modelagem de uma função matemática e a conseqüente estimativa da ASC_{0-12} ⁴. Prémaud *et al.* ⁵ desenvolveram um modelo farmacocinético, empregando estimadores bayesianos, a fim de permitir a estimativa da ASC_{0-12} a partir de três coletas de sangue (20 min, 1 h e 3 h após a dose oral de MMF). O mesmo modelo permite estimar doses para alcançar valores alvo de ASC_{0-12} .

Le Meur *et al.* ⁶ avaliaram o modelo acima descrito em um estudo clínico randomizado, comparando a taxa de falha no tratamento, caracterizada por morte, perda do enxerto, rejeição aguda e descontinuação do MMF, entre um grupo utilizando MMF em doses fixas e outro empregando o modelo farmacocinético de ajuste de doses. Os autores concluíram que o monitoramento terapêutico pode reduzir a incidência de falha no tratamento, bem como a de efeitos adversos.

Diversos métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores espectrofotométricos foram publicados para a determinação de AMF em plasma. Os métodos de preparação das amostras incluem extração em fase sólida ⁷, extração líquido-líquido ^{8,9} e precipitação de proteínas ^{2,10-13}. Atualmente, não existem imunoensaios para a determinação de AMF sendo comercializados no Brasil. Naturalmente, a determinação de AMF deve ser realizada por métodos estritamente validados para a utilização dos modelos farmacocinéticos disponíveis.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método simples e rápido para determinação de AMF por CLAE empregando um detector de arranjo de diodos (DAD), aplicável a laboratórios com recursos limitados, com o propósito de possibilitar o monitoramento terapêutico deste fármaco empregando um modelo farmacocinético baseado na estimativa da área sob a curva, através de uma estratégia de amostragem limitada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e soluções

O ácido micofenólico (AMF, (*E*)-6-(1,3-dihidro-4-hidróxi-6-metóxi-7-metil-3-oxo-5-isobenzofuranil)-4-metil-4-hexenoato) e o padrão interno (PI, ácido (*E*)-6-[1,3-dihidro-4-(4-carbóxi-butóxi)-6-metóxi-7-metil-3-oxo-5-isobenzofuranil-4-metil-4-hexenóico) foram gentilmente doados pela Roche Pharmaceuticals (Palo Alto, Estados Unidos). O fosfato de sódio monobásico foi proveniente da Nuclear (Diadema, Brasil). Ácido fosfórico 85% e acetonitrila grau CLAE foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água purificada foi obtida através de um sistema Elga Purelab Ultra da Elga Labwater (Lane End, Reino Unido). A solução-mãe de PI (1 mg/L) foi preparada através da dissolução do composto em acetonitrila. A solução de trabalho de PI foi preparada diluindo 500 µL da solução-mãe em 10 mL de acetonitrila.

Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Class VP (Kioto, Japão), composto de um sistema quaternário de bombas LC-10AT, módulo controlador SCL-10A, degaseificador DGV-14A, forno de coluna CTO-10AS, auto-injetor SIL-10AF e detector de arranjo de diodos SPD-M10A. A coluna utilizada foi Lichrospher Merck RP 8ec (250 x 4,0 mm, d.p. 5 µm) da Merck (Darmstadt, Alemanha). O sistema de cromatografia foi controlado pelo programa Class VP 6.13 SP2, da Shimadzu.

Preparação da fase móvel e condições cromatográficas

A fase móvel foi preparada através da mistura de tampão fosfato pH 2,3 (50 mM) e acetonitrila (50:50, v/v). O tampão fosfato foi preparado através da dissolução de 6,66 g de fosfato de potássio monobásico em 900 mL de água purificada, seguida da adição de 4,8 g de ácido fosfórico 85% (v/v). O volume foi completado para 1000 mL com água purificada e o pH foi ajusta-

do com a adição de ácido fosfórico ou hidróxido de potássio 0,1 M. Antes da utilização, o tampão foi filtrado através de membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 μm (Sartorius, Alemanha) e desgaseificada em banho ultra-sônico por 5 min. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min. A coluna foi mantida a 30 °C durante a análise. A detecção foi realizada a 250 nm, com a aquisição de espectros de varredura entre 200 e 380 nm.

Curva de calibração

As curvas de calibração foram obtidas através da adição de AMF em plasma humano a fim de obter amostras com concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para a construção da curva de calibração foi utilizada a média de três determinações de cada calibrador. A curva de calibração foi construída através do estabelecimento da correlação entre a razão das áreas dos picos referentes ao AMF e do PI (y) e as concentrações de AMF adicionadas (x). A curva foi avaliada com base no coeficiente de determinação (r^2).

Preparo das amostras

Uma alíquota de 250 μL de plasma, em microtubos de polipropileno, foi adicionada de 50 μL da solução de trabalho de PI (50 $\mu\text{g/mL}$) e de 450 μL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s e posteriormente foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, à 4 °C. Após, 200 μL do sobrenadante foram transferidos para um vial de vidro e adicionados de 200 μL de tampão pH 2,3, com homogeneização em vórtex por 10 s. Uma alíquota de 50 μL foi injetada no sistema CLAE-DAD.

Avaliação da seletividade

Amostras de plasma de 6 indivíduos não usuários de ácido micofenólico foram processadas e a presença de picos interferentes foi avaliada. Adicionalmente, todos os picos cromatográficos foram avaliados quanto à sua pureza espectral através do DAD.

Estabilidade

Amostras de plasma adicionadas de ácido micofenólico na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas e imediatamente armazenadas a 4 °C. Alíquotas destas amostras foram analisadas no dia da preparação e 2, 7 e 14 dias após. A estabilidade foi avaliada através do C.V. % dos valores obtidos entre os valores de concentração de ácido micofenólico calculados através da curva de calibração.

Ensaio de precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de análises de amostras calibradoras, preparadas em plasma humano, contendo ácido micofenólico nas concentrações 0,4; 0,8; 4 e 40 $\mu\text{g/mL}$. As análises foram realizadas em triplicata e repetidas em 5 dias diferentes. A precisão intra-ensaios e a precisão inter-ensaios foram calculadas pela análise de variância (ANOVA), usando dia como variável agrupadora. A exatidão foi calculada como percentagem média obtida do valor teórico adicionado na amostra.

Limites de quantificação

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração de um calibrador com C.V. % inferior a 20% (análises em triplicata).

Robustez

Foram analisadas amostras de plasma na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata, para cada parâmetro de variação avaliado: temperatura do forno (30 e 31 °C), fluxo da fase móvel (1,0 e 1,1 mL/min) e pH do tampão utilizado na preparação da fase móvel (2,3 e 2,2). Os resultados foram avaliados através do teste t de Student, com nível de confiança de 95%.

Aplicação do método

O método foi aplicado ao monitoramento terapêutico de AMF em três pacientes transplantados renais, conforme procedimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Foram colhidas amostras de sangue nos tempos 20 min, 1 h e 3 h após uma dose oral de 1 g de MMF. As amostras foram coletadas em tubo à vácuo contendo EDTA. Logo após a coleta, os tubos foram centrifugados e o plasma foi transferido para outro tubo e foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até a análise. As concentrações de AMF foram utilizadas para a estimativa da ASC_{0-12} através do modelo farmacocinético desenvolvido por Premaud *et al.*⁵ empregando a ferramenta *Immunosuppressants Bayesian Dose Adjustment* (ISBA), disponibilizado pelo Departamento de Farmacologia Clínica da Universidade de Limoges, França (<<https://pharmaco.chu-limoges.fr/abis.htm>>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as condições cromatográficas utilizadas foi possível obter uma separação adequada do AMF e do padrão interno de demais compostos presentes nas amostras analisadas. O tempo to-

tal de análise cromatográfica foi de 7 min. O pico referente ao AMF apresentou tempo de retenção médio de 5,6 min e o pico referente ao padrão interno apresentou tempo médio de retenção de 4,6 min. O uso de eluição isocrática permite ciclos analíticos rápidos quando um grande número de amostras devem ser processadas. Não foram observados picos nos tempos de retenção dos analitos em amostras de plasma isentas de AMF (Fig. 2).

A preparação da amostra, baseada na precipitação de proteínas com acetonitrila, foi simples e rápida. Apesar da decorrente diluição do AMF nesta etapa, a sensibilidade obtida foi satisfatória. Também, as condições utilizadas não propiciam um meio ácido, que pode reduzir a estabilidade do GAMF, levando à uma elevação artificial das concentrações de AMF¹³.

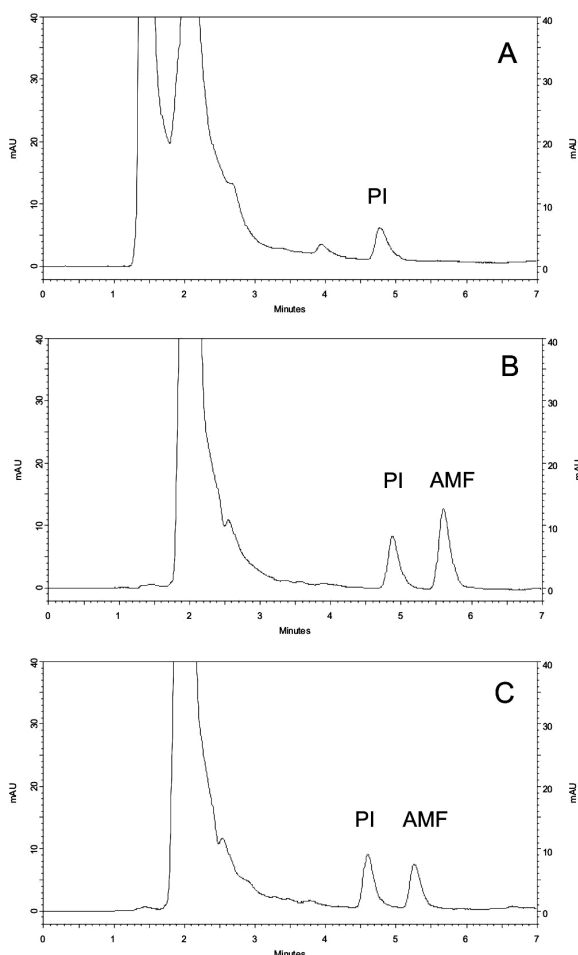


Figura 2. Separação cromatográfica obtida com monitoramento em 250 nm: (A) amostra de plasma isenta de ácido micofenólico, com padrão interno (PI); (B) calibrador contendo AMF (10 µg/mL); (C) amostra de plasma de paciente em farmacoterapia com AMF (5,1 µg/mL).

Desta forma, a conjugação do sistema de eluição isocrática com tempo curto de corrida e a preparação simples da amostra, sem etapa de concentração e evaporação de solvente, possibilita que o método seja utilizado em laboratórios com recursos limitados, de forma rápida, conjugando características que o tornam vantajoso em respeito à outros métodos anteriormente publicados⁷⁻¹³.

Em todas as análises, os picos referentes aos analitos foram avaliados com respeito à sua pureza espectral e similaridade com os espectros de absorção de referência, através de rotinas disponíveis no sistema CLAE-DAD, e não foram observados interferentes. O valor de pureza sempre foi superior a 0,9976 para AMF e PI, em todas as análises, sendo que o limiar para pureza foi determinado como 0,9950. Além disso, a utilização do detector DAD permitiu a utilização de um critério adicional de identificação dos analitos, especialmente considerando a utilização de polifármacos pelos pacientes transplantados. Os espectros de absorção entre 200 e 380 nm de AMF e do PI, devido à presença de vários máximos e mínimos, são bastante característicos, facilitando sua diferenciação de outros compostos eventualmente presentes. Ambos os compostos apresentam máximos de absorção em 215 e 250 nm, mas diferem pela presença de máximos na região próxima a 300 nm (303 e 305 nm para AMF e 291 e 295 para o PI). As concentrações de AMF mostraram-se estáveis quando as amostras de plasma são mantidas em refrigeração, em um intervalo de até 14 dias, com variação percentual entre os valores pré e pós-armazenamento inferiores a 5,0%, em concordância com os resultados de Shipkova *et al.*¹⁰.

A curva de calibração obtida apresentou linearidade adequada na faixa entre 0,1 e 50 µg/mL de AMF, com inclinação 0,1515 (erro padrão 0,0018) e intercepto -0,0067 (erro padrão 0,1097) e r^2 de 0,9999. A precisão intra-ensaios esteve entre 2,6 e 8,6% e a precisão inter-ensaios esteve entre 5,1 e 8,6%, demonstrando a adequada repetibilidade do método. A exatidão foi determinada entre 95 e 102%, também dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos preconizados por Shah *et al.*¹⁴. Considerando o propósito da metodologia proposta neste estudo, focada no monitoramento terapêutico do AMF, o limite de quantificação é bastante inferior aos menores níveis terapêuticos. Na avaliação da robustez, os valores de t encontrados para a temperatura do forno, fluxo da fase móvel e pH utilizado na preparação da fase mó-

Concentração (µg/mL)	Intra-dias (C.V. %)	Inter-dias (C.V. %)	Exatidão (%)	LDQ (µg/mL)
40,0	2,57	6,65	102,3	0,1
4,0	4,13	7,10	99,6	
0,8	5,13	8,58	95,1	
0,4	8,25	5,13	95,4	

Curva de calibração

Equação regressão linear	Coefficiente	Erro padrão	r ²	Faixa linear (µg/mL)
inclinação	0,1515	0,0018	0,9999	0,1 – 50,0
intercepto	-0,0067	0,1097		

Tabela 1. Parâmetros de validação do método

Paciente	Dose MMF (mg)	Tempo pós-transplante	AMF (µg/mL)	ASC (µg.h/mL)	Dose estimada para AUC (mg)
1	1.000	07 dias	20 min = 1,59	17,42	30 µg.h/mL = 1.750
			60 min = 2,13		45 µg.h/mL = 2.000*
	1.000	14 dias	180 min = 3,3	24,71	60 µg.h/mL = 2.000*
			20 min = 2,47		30 µg.h/mL = 1.250
1.000	14 dias	60 min = 2,29	23,70	45 µg.h/mL = 1.750	
		180 min = 5,49		60 µg.h/mL = 2.000*	
2	1.000	07 dias	20 min = 1,79	13,82	30 µg.h/mL = 2000*
			60 min = 1,68		45 µg.h/mL = 2.000*
	1.000	14 dias	180 min = 1,11	32,69	60 µg.h/mL = 2.000*
			20 min = 3,91		30 µg.h/mL = 1.500
1.000	14 dias	60 min = 3,98	37,32	45 µg.h/mL = 2.000*	
		180 min = 1,99		60 µg.h/mL = 2.000*	
3	1.000	07 dias	20 min = 15,63	32,69	30 µg.h/mL = 1000
			60 min = 7,55		45 µg.h/mL = 1.500
	1.000	14 dias	180 min = 3,31	37,32	60 µg.h/mL = 1.750
			20 min = 5,81		30 µg.h/mL = 750
1.000	14 dias	60 min = 13,21	37,32	45 µg.h/mL = 1.250	
		180 min = 4,71		60 µg.h/mL = 1.500	

Tabela 2. Dados farmacocinéticos dos participantes do estudo. * A dose máxima diária de MMF é limitada a 4.000 mg.

vel foram 0,0613; 0,0795 e 0,0752, respectivamente. Considerando o valor de t tabelado de 2,7765, para um nível de confiança de 95%, o método desenvolvido foi considerado robusto frente aos três parâmetros de variação avaliados.

Os voluntários participantes do estudo estavam sob farmacoterapia imunossupressora combinada com MMF, tacrolimus e prednisona. A administração de MMF seguiu a posologia usual de doses orais de 1000 mg, duas vezes ao dia. Os resultados obtidos nas amostras de plasma obtidas dos voluntários participantes do estudo nos tempos 20 min, 1 h e 3 h pós-dose são

apresentados na Tabela 2. Empregando o modelo cinético descrito anteriormente, quatro das seis determinações realizadas apresentaram valores de ASC₀₋₁₂ para o AMF abaixo da janela terapêutica preconizada, de 30 a 60 µg.h/L⁴, com valores entre 17,4 a 24,7 µg/mL. As duas determinações com valores dentro da janela terapêutica apresentaram valores de 32,7 e 37,3 µg/mL, apenas marginalmente superiores ao limite inferior da faixa recomendada. Embora com um número reduzido de participantes, este estudo suporta dados anteriores^{4,6} de que a dose recomendada usual de 1.000 mg de MMF em duas

doses diárias é insuficiente para obter imunossupressão suficiente em pacientes em terapia com AMF, sendo necessárias doses na ordem de 1.500 a 2.000 mg, em duas doses diárias. Esta aplicação do método demonstra sua potencialidade para adequação dos regimes posológicos de pacientes que empregam MMF, especialmente quando associada ao modelo farmacocinético desenvolvido por Prémaud *et al.* 5.

CONCLUSÃO

Um método rápido e simples para a determinação de ácido micofenólico por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado. O método foi específico, preciso, exato, sensível e robusto, tendo sido aplicado no monitoramento terapêutico do ácido micofenólico em pacientes transplantados renais, associado a um modelo farmacocinético previamente estabelecido. Os resultados estimados da área sob a curva de AMF nos voluntários indicam que a posologia usual de 1.000 mg de MMF em duas doses diárias é insuficiente para atingir exposições ao AMF dentro da janela terapêutica.

Agradecimentos. À Roche Pharmaceuticals, pela doação de amostras de referência de AMF e do PI. Ao Centro Universitário Feevale, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Bullingham, R.E., A.J. Nicholls & B.R. Kamm (1998) *Clin. Pharmacokinet.* **34**: 429-99.
2. Shaw, L.M., M. Korecka, R. Van Breeman, I. Nowak & K.L. Brayman (1998) *Clin. Biochem.* **31**: 323-8.
3. van Gelder, T., L.B. Hilbrands, Y. Vanrenterghem, W. Weimar, J. W. de Fijter, J.P. Squifflet, R.J. Hene, G.A. Verpooten, M.T. Navarro, M. Hale & A. Nicholls (1999) *Transplantation* **68**: 261-6.
4. van Gelder, T., Y. Le Meur, L.M. Shaw, M. Oellerich, D. DeNofrio, C. Holt, D.W. Holt, B. Kaplan, D. Kuypers, B. Meiser, B. Toenshoff & R.D. Mamelok (2006) *Ther. Drug Monit.* **28**: 145-54.
5. Prémaud, A., Y. Le Meur, J. Debord, J-C. Szlag, A. Rousseau, G. Hoizey, O Toupance & P. Marquet (2005) *Ther. Drug Monit.* **27**: 354-61.
6. Le Meur, Y., M. Büchler, A. Thierry, S. Caillard, F. Villemain, S. Lavaud, I. Etienne, P-F Westeel, B. H. de Ligny, L. Rostaing, E. Thervet, J.C. Szlag, J.-P. Rérolle, A. Rousseau, G. Touchard & P. Marquet (2007) *Am. J. Transplant.* **7**: 2496-503.
7. Jones, C.E., P.J. Taylor & A.G. Johnson (1998) *J. Chromatogr. B* **708**: 229-34.
8. Na-Bangchang, K., O. Supasynndh, T. Supaporn, V. Banmairuroi & J. Karbwang (2000) *J. Chromatogr. B* **738**: 169-73.
9. Bahrami, G. & B. Mohammadi (2006) *Clin. Chem. Acta* **370**: 185-90.
10. Shipkova, M., P.D. Niedmann, V.W. Armstrong, E. Schütz, E. Wieland, L.M. Shaw & M. Oellerich (1998) *Clin. Chem.* **44**: 1481-8.
11. Shipkova, M.; V.W. Armstrong, T. Schneider, P.D. Niedmann, E. Schütz, E. Wieland & M. Oellerich (1999) *Clin. Chem.* **45**: 127-9.
12. Weber, L.T., M. Shipkova, V.W. Armstrong, N. Wagner, E. Schütz, O. Mehls, L.B. Zimmerhackl, M. Oellerich & B. Tönshoff (2002) *Clin. Chem.* **48**: 517-25.
13. de Loor, H., M. Naesens, K. Verbeke, Y. Vanrenterghem & D.R. Kuypers (2008) *Clin. Chim. Acta* **389**: 87-92.
14. Shah, V. P.; K.K. Midha, J. W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R. N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan & A. Yacobi (2000) *Pharm. Res.* **17**: 1551-7.