

DETERMINAÇÃO DE BUSSULFANO EM PLASMA ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E DERIVATIZAÇÃO COM DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO

Charline Fernanda Backes, Sandrine Comparsi Wagner, Fernando Dal Pont Morisso, Marina Venzon Antunes e Rafael Linden*

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia ERS 239, 2755, 93352-000 Novo Hamburgo - RS, Brasil

Marcelo Capra

Serviço de Transplante de Medula Óssea, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rua Prof. Annes Dias, 295, 90020-090 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 5/1/12; aceito em 13/2/12; publicado na web em 30/4/12

DETERMINATION OF BUSULFAN IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTOR AND DERIVATIZATION WITH SODIUM DIETHYLDITHIOCARBAMATE. A high performance liquid chromatographic-diode array detection method for the determination of busulfan in plasma was developed and validated. Sample preparation consisted of protein precipitation followed by derivatization with sodium diethyldithiocarbamate and liquid-liquid extraction with methyl-*tert*-butyl ether. Chromatograms were monitored at 277 nm. Separation was carried out on a Lichrospher RP 18 column (5 μ m, 250 x 4 mm). The mobile phase consisted of water and acetonitrile (20:80, v/v). The method presented adequate specificity, linearity, precision and accuracy and allowed reliable determination of busulfan in clinical plasma samples, being applied to three patients submitted to bone marrow transplantation.

Keywords: busulfan; HPLC; diethyldithiocarbamate.

INTRODUÇÃO

O bussulfano (BU, 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, Figura 1) é um agente alquilante bifuncional, introduzido há mais de 50 anos na prática clínica, amplamente utilizado para o tratamento de leucemia mieloide crônica ou granulocítica.¹ Também, devido as suas propriedades mielossupressivas, é um dos medicamentos mais frequentemente utilizados em regime de altas doses em combinação com

outros agentes, como a ciclofosfamida, no tratamento mieloablativo do pré-transplante de medula óssea.¹⁻⁴

Como a maioria dos agentes alquilantes, o BU apresenta uma janela terapêutica estreita e pode ter sua biodisponibilidade influenciada por fatores como idade, obesidade, ritmo circadiano e variabilidade farmacocinética intraindividual.⁵ Concentrações abaixo da faixa terapêutica recomendada (concentrações em estado estacionário entre 800 a 900 ng mL⁻¹) estão associadas à recorrência da doença ou à rejeição do transplante, indicando ablação incompleta da medula.⁶ Por outro lado, a exposição sistêmica aumentada tem sido relacionada ao aumento de efeitos adversos e até mesmo à mortalidade prematura pós-transplante,⁷ especialmente associada com insuficiência hepática, ocasionando a doença veno-oclusiva.⁸

O protocolo padrão recomendado para a administração da forma oral de BU é de 1 mg/kg, administrado a cada 6 h durante 4 dias consecutivos, em dose total de 16 mg/kg.⁸⁻¹⁰ Desta forma, se faz necessária a disponibilidade de métodos analíticos para a determinação dos níveis plasmáticos do BU que sejam capazes de fornecer resultados em um curto espaço de tempo, permitindo assim a determinação da área sob a curva (ASC) após a 1ª dose administrada e o ajuste de dose já na 3ª dose, com o processamento das amostras e a elaboração das recomendações farmacocinéticas em um tempo máximo de 6 h.^{11,12}

Diversos métodos analíticos para a determinação de BU através de técnicas cromatográficas já foram descritos na literatura. Os sistemas de cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM) são as técnicas de escolha em termos de sensibilidade, porém estes sistemas sofisticados de detecção nem sempre estão disponíveis nos laboratórios clínicos, especialmente devido ao seu alto custo de aquisição.¹³⁻¹⁵ Uma alternativa, em virtude do custo reduzido e maior disponibilidade, é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) após etapa de derivatização.¹⁶⁻²¹ A molécula do BU não apresenta cromóforos e, portanto, não absorve luz UV ou visível nos comprimentos de onda usuais, não podendo ser detectado por detectores de ultravioleta. Desta forma,

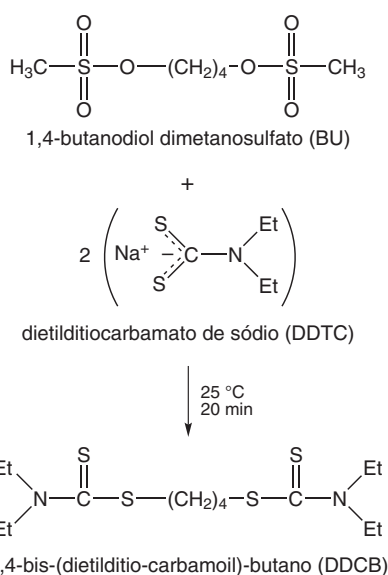


Figura 1. Reação de derivatização do bussulfano (BU) com dietilditiocarbamato de sódio (DDTC), resultando na formação de 1,4-bis-(diethyldithio-carbamoyl)-butano (DDCB)

*e-mail: rafael.linden@feevale.br

uma derivatização adicionando cromóforos ao BU é essencial para que seja possível sua detecção UV. Em estudos anteriores,¹⁶⁻¹⁸ os autores propuseram a derivatização do BU com dietilditiocarbamato de sódio (DDTC), com a formação de 1,4-bis-(dietilditio-carbamoil)-butano (DDCB) (Figura 1), molécula com intensa absorção de luz na região ultravioleta e, portanto, facilmente detectável em sistemas CLAE-UV.

Este trabalho descreve a padronização, otimização e validação de um método para a determinação de BU por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD), após derivatização com DDTC. Considerando a natureza multifatorial da reação de derivatização, a otimização dos parâmetros envolvidos nesta etapa da análise foi realizada através de um desenho estatístico experimental do tipo Box-Behnken. O método foi aplicado na avaliação da terapia com BU prévio ao transplante de medula óssea (TMO) em três pacientes.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e materiais

Bussulfano (BU), N,N-dimetilacetamida e dietilditiocarbamato de sódio tri-idratado (DDTC) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). Metil-*tert*-butil éter (MTBE) e acetonitrila grau CLAE foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Toda água utilizada foi purificada com purificador Pure Lab Ultra, proveniente da Elga Lab Water do Brasil (Cotia, Brasil).

Preparação das soluções e padrões

A solução mãe de BU ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada pela dissolução de 0,01 g do padrão analítico de BU em 100 mL de N,N-dimetilacetamida. Para a solubilização adequada, a mistura foi submetida a banho ultrassônico por 15 min. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição da solução mãe com acetonitrila, de forma a se obter soluções contendo 50; 25; 10; 5 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BU. A solução derivatizante de DDTC (2,2 M) em água foi preparada diariamente. Água ultrapura utilizada na preparação da fase móvel foi filtrada diariamente com membrana de acetato de celulose de 0,2 μm da Sartorius (Göttingen, Alemanha).

Equipamento e condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Accela[®] constituído por um sistema quaternário de bombas Accela 600, auto-amostrador e detector de arranjo de diodos, fornecidos pela Thermo Fisher Scientific (San Jose, USA). O sistema foi gerenciado através do sistema Chromquest[®], também da Thermo Fisher Scientific. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa RP 18 Lichrospher[®] (250 x 4 mm, d.p. 5 μm), adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), a qual foi mantida a 40 °C durante a análise. A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e água (80:20 v/v), com vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Os extratos foram mantidos no autoamostrador a 10 °C até a injeção. O tempo de análise cromatográfica foi de 8 min, com aquisição de espectros para todos os picos na faixa de 200 a 380 nm e com monitoramento cromatográfico em 277 nm.

Otimização da derivatização

As condições experimentais para a derivatização do BU com DDTC foram selecionadas através de metodologia de análise de superfície de resposta, que é definida como um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas para modelar e analisar problemas nos quais uma variável de resposta é influenciada por diversas variáveis operacionais, com o objetivo de otimizar esta resposta.²²

Através de um desenho experimental adequado é possível obter uma equação de regressão de 2ª ordem, que descreve a relação entre as variáveis do processo e a variável de resposta. Para modelar as superfícies de resposta foi selecionado um desenho experimental do tipo Box-Behnken, com as seguintes variáveis experimentais e níveis de avaliação: temperatura de incubação (25; 37,5 e 50 °C), concentração do DDTC (0,5; 1,5 e 2,5 M) e tempo de incubação (5; 12,5 e 20 min), com um total de 17 experimentos. A variável de resposta foi a área do DDCB (Tabela 1).

Os cálculos foram realizados utilizando o programa Design Expert[®] 7.0 da Stat-Ease (Minneapolis, EUA).

Preparações das amostras

Uma alíquota de 200 μL de plasma foi transferida para um microtubo de polipropileno e foi adicionada de 200 μL de acetonitrila. Após agitação em vortex por 30 s, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min. Posteriormente, foi realizada etapa de derivatização, que seguiu as condições determinadas pelo experimento de otimização. Para tal, 300 μL do sobrenadante foram transferidos para novo microtubo de polipropileno e adicionados de 200 μL de água ultrapurificada e 250 μL de DDTC 2,2 M. A mistura foi incubada a 25 °C por 20 min. Em seguida, o derivatizado foi extraído com a adição de 1200 μL de MTBE, seguida por homogeneização em vortex por 1 min e centrifugação por 10 min a 12.000 g. Uma alíquota de 1000 μL da fase orgânica foi transferida para um novo microtubo de polipropileno de 1,5 mL e evaporada sob corrente de ar e a 50 °C. O extrato seco foi retomado com 100 μL de fase móvel e uma alíquota de 25 μL foi injetada no sistema CLAE-DAD.

Seletividade

Para a avaliação da especificidade/seletividade do ensaio foram testadas 6 amostras de plasma isentas de BU para a investigação da presença de interferentes com o mesmo tempo de retenção do analito. A utilização do detector de arranjo de diodos também possibilitou verificar a pureza espectral dos picos de DDCB nos cromatogramas.

Estabilidade de congelamento e descongelamento

Para a avaliação da estabilidade do BU nas amostras de plasma a ciclos de congelamento e descongelamento foram analisadas, em triplicata, amostras de plasma contendo o analito em 3 concentrações diferentes (0,2; 2 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), após terem sido submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Em cada ciclo as amostras foram mantidas a -20 °C por 24 h, sendo descongeladas e mantidas à temperatura ambiente 1 h antes do seu processamento. As concentrações foram calculadas a partir de calibrações diárias e a variância avaliada através de ANOVA. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Sensibilidade

O limite inferior de quantificação (LIQ) do método foi estabelecido a partir das análises em triplicata do menor ponto da curva de calibração ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em 3 dias. Os critérios para aceitação do LIQ foram exatidão de $100 \pm 20\%$ do valor nominal e um CV% entre as réplicas intra e interdia máximo de 20%.²³

Linearidade

Alíquotas de 900 μL de plasma branco foram adicionadas de 100 μL da solução de trabalho correspondente de BU, de forma a obter

calibradores nas concentrações 0,1; 0,25; 0,50; 1,0, 2,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os calibradores foram processados em sextuplicata, conforme descrito em Preparação das amostras. A curva de calibração foi construída através de regressão linear, estabelecendo a correlação entre a área do pico de BU e sua concentração nominal no calibrador. A homocedasticidade dos dados da calibração foi avaliada através do teste F, com intervalo de confiança de 95%. As curvas analíticas foram ajustadas por regressão linear utilizando diversos fatores ponderais ($1/x$, $1/x^{0.5}$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^{0.5}$, $1/y^2$). Os modelos de calibração foram avaliados pelos seus coeficientes de correlação (r), soma dos resíduos (ΣR) e erro percentual acumulativo ($\Sigma\%RE$), conforme Almeida *et al.*²⁴ Foram preparadas curvas de calibração diárias (uma réplica de concentração do calibrador) em todas as análises de validação e amostras de pacientes.

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram validadas pelas análises em triplicata de amostras de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) (0,2; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), repetidas em 5 dias diferentes. A exatidão foi definida como a porcentagem da concentração nominal representada pela concentração estimada com a curva de calibração. Os coeficientes de variação foram calculados através de ANOVA, usando "dia" como variável agupadora. O critério de aceitação para exatidão foram valores entre 85 a 115% do valor teórico esperado e para precisão intra e interensaio foi CV máximo de 15%.²³

Rendimento da extração

A eficiência da extração foi definida através da comparação das áreas dos picos dos analitos obtidos nas amostras de plasmas dos experimentos de exatidão e precisão, com os picos obtidos das soluções de BU em acetonitrila em níveis correspondentes à recuperação completa, medido em triplicata nas mesmas concentrações de precisão e exatidão. A eficiência foi expressa em porcentagem da concentração das amostras de referência.

Aplicação do método

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Porto Alegre, Brasil, parecer 111/11) e os participantes do estudo manifestaram sua concordância através da assinatura do termo de consentimento. O método foi aplicado na avaliação da terapia oral com BU de 3 pacientes em regime preparatório para o TMO. Foram colhidas, por meio de punção venosa, amostras de sangue em 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 3,0; 4,0 e 6 h após a administração da 1ª dose de BU. Após as coletas, os tubos contendo EDTA como anticoagulante foram centrifugados (2.000 rpm por 10 min) e o plasma foi separado e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises. A ASC entre 0 e 360 min (ASC_{0-360}) foi calculada através da regra trapezoidal e a ASC entre 360 min e infinito ($ASC_{360-\infty}$) foi calculada através da divisão da concentração de BU em 360 min pela constante de eliminação terminal (k_d). A partir da ASC total ($ASC_{0-360} + ASC_{360-\infty}$) e da dose administrada foi possível determinar a depuração de BU (em mL/min kg) e, por consequência, a concentração em estado estacionário (C_{ee} , ng mL^{-1}). A nova dose ajustada foi calculada pela multiplicação da dose atual (mg) pela razão entre a C_{ee} desejada e a C_{ee} determinada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da derivatização

A etapa de derivatização permite a detecção de BU por CLAE

com detectores UV devido à formação do DDCB, um produto com marcada absorvidade na região espectral do ultravioleta (Figura 1). Considerando os múltiplos fatores que influenciam o rendimento da reação de derivatização, as condições experimentais para este procedimento devem cuidadosamente otimizadas. Neste estudo, a otimização da derivatização do BU com DDTC foi realizada através de um desenho experimental do tipo Box-Behnken, especialmente devido a sua economicidade (apenas 17 análises), e pela possibilidade de modelar superfícies de resposta e, por consequência, calcular as condições experimentais que maximizam a resposta. As variáveis analisadas neste estudo foram concentração do agente derivatizante (DDTC), temperatura e tempo de incubação da mistura reacional. A variável otimizada foi a área do pico de DDCB. Os níveis das variáveis estudadas e os resultados obtidos estão representados na Tabela 1. A resposta foi modelada através de uma equação quadrática incluindo todos os fatores e suas interações. O modelo reduzido, expresso na Equação 1, foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) e apresentou adequação de ajuste significativo e falta de ajuste não significativo ($P > 0,05$), o que corrobora sua aplicação para modelar o processo de derivatização do BU.

Tabela 1. Desenho experimental de otimização da derivatização do BU com DDTC

Experimento	DDTC (M)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	Área DDCB (mAU min)
1	1,5	50,0	5,0	394953
2	0,5	37,5	5,0	350936
3	1,5	37,5	12,5	831956
4	1,5	37,5	12,5	1150850
5	1,5	37,5	12,5	2098220
6	1,5	37,5	12,5	1915700
7	1,5	25,0	5,0	1749140
8	0,5	50,0	12,5	1226730
9	1,5	37,5	12,5	2216620
10	2,5	37,5	5,0	2441750
11	2,5	37,5	20,0	2518760
12	2,5	25,0	12,5	2834460
13	0,5	37,5	20,0	1977590
14	1,5	50,0	20,0	3098990
15	2,5	50,0	12,5	3159180
16	0,5	25,0	12,5	1083030
17	1,5	25,0	20,0	2875880

Considerando a adequação do modelo, foi possível calcular as condições operacionais otimizadas com base na Equação 1 e na avaliação dos gráficos de contorno (Figura 1). A eficiência da derivatização foi maior com o aumento do tempo de incubação e da concentração de DDTC até 2,2 M, onde atingiu seu nível máximo. Por outro lado, o fator temperatura de incubação demonstrou pequeno efeito sobre a resposta, a qual inclusive apresentou declínio com o aumento da temperatura.

$$\text{Área do pico de DDCB} = -2,10807E+005 + (7,89482E+005 \times \text{concentração derivatizante}) - (6626,64000 \times \text{temperatura}) + (92240,73333 \times \text{tempo}) \quad (1)$$

Desta forma, a condição otimizada, selecionada para a obtenção da curva de calibração, para os demais ensaios de validação e para a

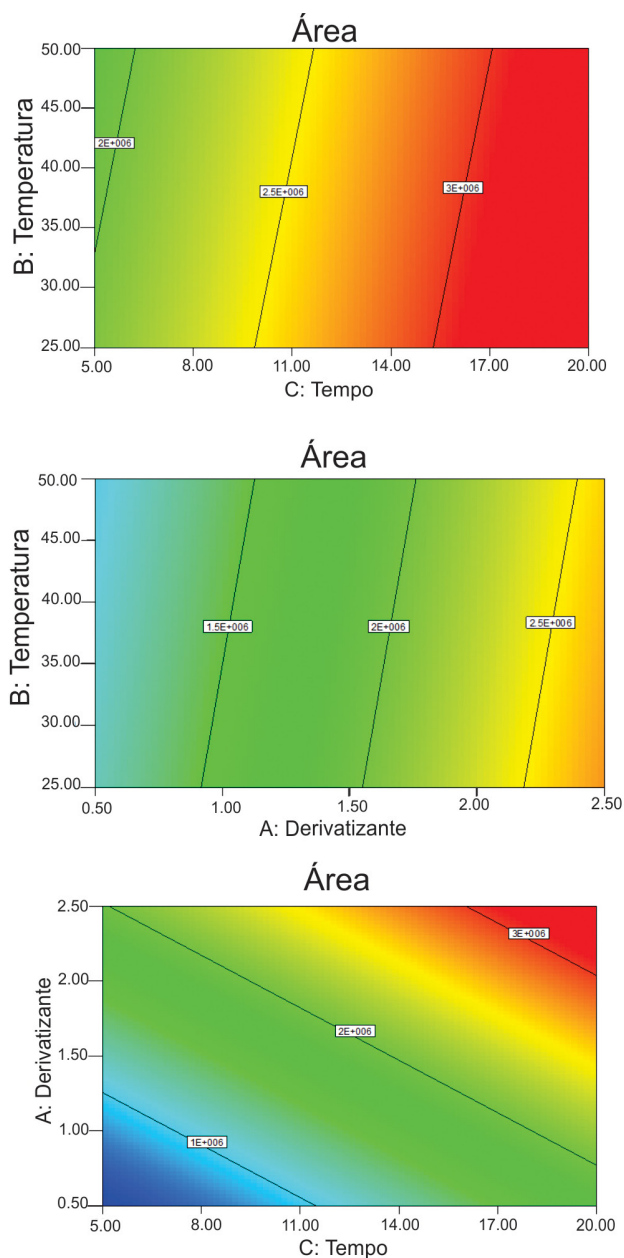


Figura 2. Gráficos de contorno para área do pico do derivatizado (DDCB). A: fatores temperatura (°C) x tempo (min). B: fatores temperatura (°C) x concentração de derivatizante (M). C: fatores concentração de derivatizante (M) x tempo (min)

aplicação do método, empregou solução de DDTC a 2,2 M, temperatura de incubação de 25 °C e tempo de incubação de 20 min (Figura 2).

Extração do DDCB

Para o desenvolvimento desse método, optamos por utilizar um processo de extração líquido-líquido com MTBE, solvente que possibilitou rendimentos de extração de DDCB superiores a 90% com apenas uma etapa de extração, utilizando um pequeno volume de solvente de apenas 1,2 mL (Tabela 2). Além disso, o MTBE é rapidamente evaporado e apresenta alta seletividade pelo analito, resultando em extratos relativamente limpos que não requereram etapa adicional de extração ou purificação para eliminação de interferentes. O procedimento de extração foi simples, rápido e adequadamente seletivo para o DDCB.

Tabela 2. Precisão, exatidão e rendimento da extração*

Amostra CQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração nominal	Precisão (CV%)		Exatidão (%)	Rendimento extração (%)
		Intraensaio	Interensaio		
CQLQ	0,10	10,8	5,2	104,9	-
CQB	0,20	8,4	7,4	98,3	94
CQM	2,00	6,3	10,0	98,9	92
CQA	4,00	8,7	6,9	103,9	92

* (n = 15 para CQB, CQM e CQA; n = 9 para CQLQ)

Condições cromatográficas e parâmetros de validação

Nas condições analíticas selecionadas, o tempo total de análise cromatográfica foi de 8 min, com eluição do DDCB em 6,73 min. Na Figura 3 são apresentados os cromatogramas típicos adquiridos com o método de análise (plasma branco, amostra controle BU 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e amostra de paciente 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

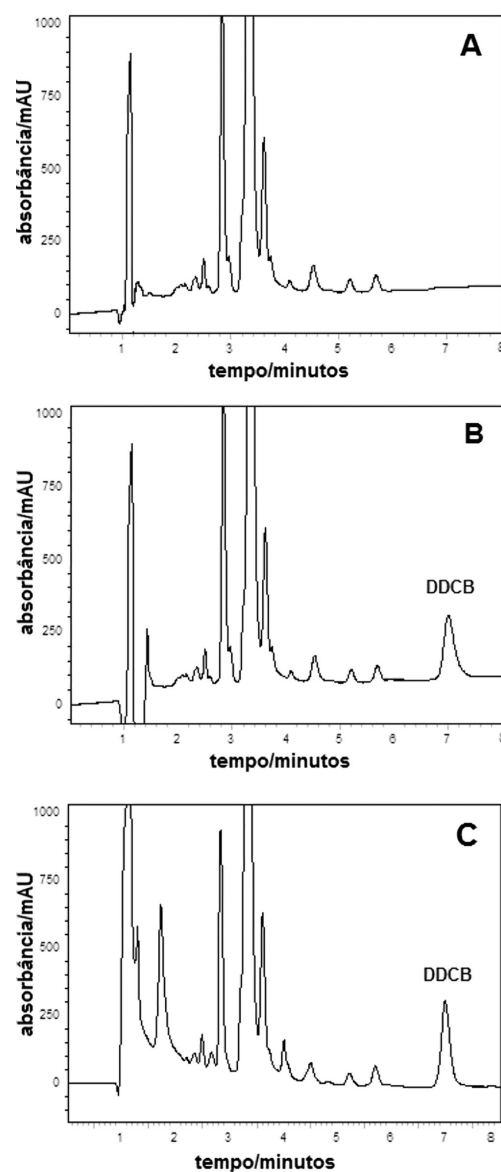


Figura 3. Cromatogramas monitorados em 277 nm. A: amostra de plasma branco; B: amostra de plasma controle contendo BU na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C: amostra de plasma de paciente contendo BU na concentração de 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Validação do método

Durante os ensaios de seletividade, não foram observados interferentes endógenos nas análises de amostras de plasma branco, o que pode ser observado na Figura 3. O DDCB apresenta máximos de absorvidade em 224, 253 e 277 nm, sendo que os espectros de absorção UV relativos ao analito foram comparados com espectros de referência, apresentando índices de similaridade sempre superiores a 0,995. Foi avaliada a pureza espectral dos picos de DDCB de todas as amostras, através de rotina computacional própria do programa Chromquest®, sem a identificação de outros compostos nos picos avaliados.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do analito em ciclos de congelamento e descongelamento. Não houve nenhuma indicação de instabilidade do BU nas amostras de plasma durante 3 ciclos ($P > 0,05$).

Tabela 3. Estabilidade de congelamento e descongelamento

BU ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração após cada ciclo (n = 3)			P (ANOVA)
	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia	
0,20	0,17	0,17	0,16	0,58
2,00	2,03	2,22	1,97	0,36
4,00	4,24	4,34	4,43	0,71

Foram preparadas curvas analíticas a partir da análise em sextuplicata de 6 níveis de concentrações de BU e foram avaliadas através de seus coeficientes de correlação (r), soma dos resíduos (ΣR) e do erro percentual acumulado relativo ($\Sigma \%RE$). Considerando que os dados de calibração apresentaram significativa heterocedasticidade ($F_{\text{exp}} = 210,73$; $F_{\text{tab}}(5,5; 0,95) = 5,05$), foram avaliados vários modelos de regressão ponderal. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,998 para todos os fatores de ponderação. O inverso do quadrado da concentração ($1/x^2$) foi selecionado como o melhor fator de ponderação, com os valores de $8,30 \times 10^{-16}$ para ΣR e de $1,46 \times 10^{-14}$ para $\Sigma \%RE$, contrastando com os valores de $-0,032$ para ΣR e de $1,46 \times 10^{-14}$ para $\Sigma \%RE$ quando foi aplicada a regressão não ponderal. As concentrações calculadas em todos os calibradores encontram-se dentro de critérios amplamente utilizados em validação de métodos bioanalíticos.²³

A sensibilidade encontrada apresentou-se adequada, com LIQ de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. A amostra de CQLQ apresentou exatidão de 104,9% e precisão intra e interensaio de 10,8 e 5,2%, respectivamente. Os valores encontrados nos ensaios de precisão e exatidão estão apresentados na Tabela 2. Os valores de exatidão estiveram entre 98,3 a 103,9% das concentrações nominais. A precisão intraensaio apresentou valores entre 6,3 a 8,7% e a precisão interensaio, entre 6,9 a 10%. Todos os valores encontraram-se dentro dos valores de aceitação para métodos bioanalíticos.¹⁷

Comparação com outros estudos

Diversos métodos já foram publicados para a determinação de BU por CLAE-UV, todos com o emprego de reações de derivatização.¹⁶⁻²¹ Com exceção de um estudo,¹⁹ os demais trabalhos publicados também utilizaram DDTC como derivatizante, porém em concentrações (0,22

a 1,17 M) e tempos de reação (0 a 5 min) inferiores aos utilizados neste estudo. Na avaliação das condições experimentais da derivatização, verificou-se que os fatores tempo e concentração do derivatizante são fundamentais no aumento da eficiência da reação. Desta forma, é provável que os estudos prévios tenham empregado condições de reação subótimas, o que pode ter reduzido a sua sensibilidade.

No presente trabalho foi utilizado um volume reduzido de plasma (200 μL), tal como nos métodos propostos em trabalhos anteriores,^{12,20} com limites de quantificação semelhantes (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação a 0,15 e 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Os trabalhos anteriores que empregaram derivatização com DDTC utilizaram preparações de amostras mais complexas que as empregadas no presente estudo, seja através de extrações líquido-líquido seguidas de extrações em fase sólida do produto de reação,^{16,20} múltiplas etapas de extração líquido-líquido,¹⁸ ou por extração líquido-líquido seguida de uma etapa de *column switching*.¹⁷ No presente estudo a extração líquido-líquido em etapa única apresentou seletividade suficiente, sem a necessidade de processo de filtração ou posterior extração, simplificando e diminuindo o tempo de execução da técnica em relação aos trabalhos supracitados.

Os métodos que utilizaram CLAE para determinação de BU apresentaram tempo de corrida cromatográfica superior a 8 min, utilizado neste estudo. Os tempos de análise cromatográfica dos estudos anteriores estiveram entre 10 e 30 min,^{19,20} associados a preparações de amostra mais complexas, o que representa uma limitação quando há a necessidade de realização de análises com baixo tempo de execução, como no caso do monitoramento terapêutico de BU. O consumo de fase móvel durante as análises está diretamente relacionado ao tempo de corrida cromatográfica e vazão do solvente. No presente estudo o consumo de fase móvel por corrida analítica (9,6 mL) foi inferior aos demais trabalhos que utilizaram CLAE (12 até 30 mL),^{12,19-21} o que permite uma redução dos custos analíticos e uma menor produção de resíduos químicos.

Aplicação do método

O método otimizado foi aplicada na avaliação da terapia com BU de três pacientes submetidos ao pré-tratamento para o transplante de medula óssea, representando todos os pacientes submetidos a este procedimento e sob uso de BU entre maio e dezembro de 2011, em um centro transplantador de referência. As amostras foram colhidas após a administração da primeira dose oral de BU, sendo que em todos os pacientes, foi possível concluir todas as análises das 8 amostras de plasma e emitir o aconselhamento farmacocinético antes da terceira dose do ciclo de condicionamento. Na Tabela 4 são apresentados os resultados das determinações de BU nas amostras clínicas. A partir das concentrações plasmáticas de BU, foram estimados os parâmetros farmacocinéticos $ASC_{0-\infty}$, C_{ce} e depuração. Todos os pacientes apresentaram C_{ce} dentro da janela terapêutica de 800 a 900 ng mL^{-1} , não sendo necessária a indicação de ajuste de dose do BU.

CONCLUSÃO

Otimizou-se e validou-se um método para determinação de bussulfano em amostras de plasma, empregando CLAE-DAD e

Tabela 4. Dados demográficos e resultados dos estudos farmacocinéticos em pacientes sob terapia com BU

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Dose mg (mg kg^{-1})	ASC ($\mu\text{g min mL}^{-1}$)	C_{ce} (ng mL^{-1})	Depuração (mL min kg^{-1})	Dose estimada 800/900 ng mL^{-1}
1	M	33	70	70 (1,0)	305,8	849,3	3,27	66 / 74
2	F	17	50	42 (0,84)	316	877,8	2,66	38 / 43
3	M	32	67	66 (0,99)	297,2	825,6	3,03	64 / 82

derivatização com dietilditiocarbamato de sódio. As condições experimentais da etapa de derivatização foram otimizadas através de metodologia de superfície de resposta, o que resultou em concentrações de derivatizante e tempo de reação inéditos para esta aplicação. Os parâmetros precisão, exatidão e sensibilidade encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para métodos bioanalíticos e são adequados para o monitoramento do medicamento de bussulfano em regimes preparatórios para transplante de medula óssea. O procedimento analítico, incluindo extração, derivatização e análise, permitiu processar 8 amostras de plasma em aproximadamente 3 h, sendo suficientemente rápido para aplicação no monitoramento dos níveis de BU em condições clínicas.

REFERÊNCIAS

- Bullock, J. M.; Smith, P. F.; Booker, M.; Loughner, J.; Capozzi, D.; McCarthy, P. L. Jr.; Shaw, L. M.; *Ther. Drug Monit.* **2006**, *28*, 62.
- Barterlink, I. H.; Bredius, R. G. M.; Ververs, T. T.; Raphael, M. F.; Kesteren, C. V.; Bierings, M.; Rademaker, C. M. A.; Hartigh, J. D.; Uiterwaal, C. S. P. M.; Zwaveling, J.; Boelens, J. J.; *Biol. Blood Marrow Tr.* **2008**, *14*, 88.
- Hoffer, E.; Akria, L.; Tabak, A.; Scherb, I.; Rowe, J. M.; Krivoy, N.; *Ther. Drug Monit.* **2004**, *26*, 331.
- Brostom, B.; Enockson, K.; Johnson, A.; Bruns, A.; Blazar, B.; *Pediatr. Transplant.* **2003**, *7*, 12.
- Mellgren, K.; Nilsson, C.; Fasth, A.; Abrahamsson, J.; Winiarski, J.; Ringdén, O.; Hassan, M.; *Bone Marrow Transplant.* **2008**, *41*, 621.
- Deeg, H. J.; Storer, B.; Slattery, J. T.; Anasetti, C.; Doney, K. C.; Hansen, J. A.; Kiem, H. P.; Martin, P. J.; Petersdorf, E.; Radich, J. P.; Sanders, J. E.; Shulman, H. M.; Warren, E. H.; Witherspoon, R. P.; Bryant, E. M.; Chauncey, T. R.; Getzendaner, L.; Storb, R.; Appelbaum, F. R.; *Blood* **2002**, *100*, 1201.
- Morale-Ramirez, P.; Pasaye, S. M.; Cruz-Valejjo, V. L.; Vallarino-Kelly, T.; Mendiola-Cruz, M. T.; *Arch. Med. Res.* **2006**, *37*, 316.
- Schechter, T.; Finkelstein, Y.; Doyle, J.; Verjee, Z.; Moretti, M.; Koren, G.; Dupuis, L. L.; *Biol. Blood Marrow Tr.* **2007**, *13*, 307.
- Takama, H.; Tanaka, H.; Nakashima, D.; Ueda, R.; Takaue, Y.; *Bone Marrow Transplant* **2006**, *37*, 345.
- Takamatsu, Y.; Sasaki, N.; Ogata, K.; Yukawa, E.; Jimi, S.; Hara, S.; Tamura, K.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65*, 1203.
- Tabak, A.; Hoffer, E.; Rowe, J. M.; Krivoy, N.; *Ther. Drug Monit.* **2001**, *23*, 526.
- Schiltmeyer, B.; Klingebiel, T.; Schwab, M.; Mürdter, T. E.; Ritter, C. A.; Jenke, A.; Ehninger, G.; Gruhn, B.; Würthwein, G.; Boos, J.; Hempel, G.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *52*, 209.
- Bunch, D. R.; Heideloff, C.; Ritchie, J. C.; Wang, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 3255.
- Snyder, M. L.; Ritchie, J. C.; *Methods Mol. Biol.* **2010**, *603*, 129.
- Reis, E. O.; Vianna-Jorge, R.; Suarez-Kurtz, G.; Lima, E. L. S.; Azevedo, D. A.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1666.
- Chow, D. S.-L.; Bhagwatwar, H. P.; Phadungpojna, S.; Andersson, B. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *704*, 277.
- Funakoshi, K.; Yamashita, K.; Chao, W.; Yamaguchi, M.; Yashiki, T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *660*, 200.
- Xu, A. Q.; Kazerooni, R.; Thapar, J. K.; Andersson, B. D.; Madden, T. L.; *Chromatographia* **2009**, *70*, 1505.
- Quernin, M. H.; Poonkuzhali, B.; Médard, Y.; Dennison, D.; Srivastava, A.; Krishnamoorthy, R.; Chandy, M.; Jacqz-Aigrain, E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *721*, 147.
- Bleyzac, N.; Barou, P.; Aulagner, G.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *742*, 427.
- Heggie, J. R.; Wu, M.; Burns, R. B.; Ng, C. S.; Fung, H. C.; Knight, G.; Barnett, M. J.; Spinelli, J. J.; Embree, L.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *692*, 437.
- Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; *Response Surface Methodology*, 2nd ed.; Wiley-Interscience: New York, 2002.
- Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W. A.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.
- Almeida, A. M.; Castel-Branco, M. M.; Falcão, A. C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *774*, 215.