



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI
RESTRIÇÃO DE ACESSO**

MICHELE VAZ DOS ANJOS

**Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para
análise da cefepima e do metronidazol em plasma e
microdialisado peritoneal de ratos Wistar**

Dissertação apresentada à
Universidade de Caxias do Sul, para
obtenção do título de mestra em
Ciências da Saúde.

Caxias do Sul

2022

MICHELE VAZ DOS ANJOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DA CEFEPIMA E DO
METRONIDAZOL EM PLASMA E MICRODIALISADO
PERITONEAL DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à
Universidade de Caxias do Sul para
obtenção do título de mestra em
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso

Caxias do Sul
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

A599d Anjos, Michele Vaz dos

Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para análise de cefepima e do metronidazol em plasma e microdialisado peritoneal de ratos Wistar [recurso eletrônico] / Michele Vaz dos Anjos. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientação: Leandro Tasso.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cefepima. 2. Metronidazol. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Peritonite. 5. Ratos Wistar. I. Tasso, Leandro, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 615.281.9

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROF. DR. JOSÉ MAURO MADI

Michele Vaz dos Anjos

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DA CEFEPIMA E DO METRONIDAZOL
EM PLASMA E MICRODIALISADO PERITONEAL DE RATOS
WISTAR**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Leandro Tasso (UCS)

Banca examinadora:

Profa. Dra. Lessandra Michelin (UCS)

Profa. Dr. Thiago Barcellos da Silva (UCS)

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo (UFRGS)

Dedicatória

À minha família, amigos e colegas.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos que participaram dessa incrível trajetória. Às minhas colegas de pesquisa, Larissa Bergoza, Eduarda Pozza e Gisele da Silva, que foram essenciais à elaboração desta pesquisa, compartilhando comigo o dia a dia no laboratório e apoiando-me em todos os momentos. À minha família, em especial, meu marido, Victor Hugo, minhas filhas, Helena e Maria Victória, e aos meus pais, Luis Carlos e Regina, por todo o suporte oferecido nessa empreitada.

Também gostaria de agradecer à Universidade de Caxias do Sul – na figura de seus professores e funcionários – que proporcionou um ambiente de aprendizagem e desenvolvimento, possibilitando a realização de um estudo de excelência. Agradeço, ainda, ao Dr. Paulo Roberto dos Santos, pelos ensinamentos e pela paciência. Por fim, mas não menos importante, ao Prof. Dr. Leandro Tasso, por ter aceitado guiar-me nesta jornada acadêmica, bem como pelo seu empenho no desenvolvimento desta investigação.

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura química da cefepima.....	19
Figura 2 – Estrutura química do metronidazol.....	20
Figura 3 – Funcionamento de uma sonda de microdiálise	21

Lista de tabelas

Tabela 1 – Determinação da cefepima em matrizes biológicas	22
Tabela 2 – Determinação do metronidazol em matrizes biológicas	24

Lista de abreviaturas e siglas

ACN	Acetonitrila
ASC	Área sob a curva
CEF	Cefepima
CIM	Concentração inibitória mínima
CI	Clearance (depuração)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coeficiente de variação
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Massa/massa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	Fluido peritoneal
IV	Intravenoso
LC ESI QTOF –MS	Cromatografia líquida com ionização por eletrospray
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MD	Microdiálise
NaCl	Cloreto de sódio
MTZ	Metronidazol
PS	Peritonite secundária
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
v/v	Volume/Volume
Vdss	Volume de distribuição no estado de equilíbrio

RESUMO

A cefepima (CEF) e o metronidazol (MTZ) são dois antimicrobianos que podem ser usados para o tratamento da peritonite secundária. Diferentes metodologias analíticas estão descritas para a quantificação desses analitos em matrizes biológicas, mas não há relatos para a determinação das concentrações livres desses antimicrobianos no fluido peritoneal de ratos. Assim, este estudo tem o objetivo de desenvolver e validar duas metodologias analíticas para medir as concentrações livres desses fármacos no fluido peritoneal de ratos Wistar. Desse modo, para a CEF, foi desenvolvido um método de quantificação empregando a técnica de cromatografia líquida e de detecção por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (LC-ESI-QTOF-MS), onde foi empregada uma coluna C18 Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (250 mm × 4,6 mm) e uma pré coluna (C18 4 mm, 5 µm; Phenomenex). A fase móvel foi composta por (A) água ultrapura com pH a 3,5 e (B) acetonitrila (80:20, v/v). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A quantificação foi realizada no modo positivo para monitorar os íons com m/z 481,1311 para CEF e com m/z 171,0283 para o PI. Para o MTZ, a quantificação foi conduzida empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE – UV/VIS). A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna C18, com fluxo de 1,6 mL/min a 40°C, com fase móvel composta por acetonitrila e solução aquosa de tampão fosfato monobásico 50 mM, com 0,1% de trietilamina a pH 3,0 (10:90, v/v). A linearidade foi atingida em ambos os métodos com coeficiente de determinação $\geq 0,99$ para as matrizes plasma e fluido peritoneal. Os resultados dos parâmetros de desempenho analítico para os analitos investigados atenderam ao preconizado pelo guia de validação de métodos bioanalíticos da *Food and Drug Administration*. A aplicabilidade dos métodos foi demonstrada em estudo farmacocinético piloto em ratos Wistar após a administração intravenosa (bolus) de 110 mg/kg de CEF e de 30 mg/kg de MTZ. Para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos foi utilizado o software Phoenix versão 6.4.

Palavras-chave: Cefepima. Metronidazol. CLAE-UV, LC-ESI-QTOF-MS. Validação bioanalítica.

ABSTRACT

Cefepime (CEF) and metronidazole (MTZ) are two antimicrobial agents which can be used to treat secondary peritonitis. Different analytical methodologies have been described for the quantification of these analytes in biological matrices, but there are no reports addressing the determination of concentrations free of these antimicrobials in the peritoneal fluid of rats. Therefore, this study aimed to develop and validate two analytical methodologies to measure concentrations free of these substances in the peritoneal fluid of Wistar rats. Regarding CEF, a quantification method has been developed by using the technique of liquid chromatography coupled with electrospray ionization high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS), with a Shimadzu Shim-pack CLC-ODSC18 column (250 mm x 4.6mm) and a pre-column (5 μ m C18, 4mm; Phenomenex). The mobile phase consisted of (A) ultrapure water with a pH of 3.5, and (B) acetonitrile (80:20, v/v). The flow rate was 0.8mL/min, and the injection volume was 20 μ L. Quantification was carried out in the positive mode to monitor ions with m/z of 481.1311 for CEF and with m/z of 171.0283 for PI. Regarding MTZ, quantification has been conducted using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV/VIS). Chromatography run was carried out on a C18 column, with a flow rate of 1.6 mL/min at 40°C, with a mobile phase composed of acetonitrile and an aqueous solution of 50 mM monobasic phosphate buffer, with 0.1% of triethylamine at pH 3.0 (10:90, v/v). Linearity was achieved in both methods with a coefficient of determination ≥ 0.99 for plasma and peritoneal fluid matrices. The results of the analytical performance parameters for the analyzed analytes met the criteria of the Food and Drug Administration's Bioanalytical Method Validation Guidance. The applicability of the methods was demonstrated in a pilot pharmacokinetic study in Wistar rats after intravenous administration (bolus) of 110 mg/kg of CEF and 30 mg/kg of MTZ. To determine the pharmacokinetic parameters, the version 6.4 of the Phoenix software was used.

Keywords: Cefepime, Metronidazole, HPLC-UV, LC-ESI-QTOF-MS, Bioanalytical validation.