



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Manoella Santos de Borborema Fernandes

**Cinética na gravidez e passagem transplacentária da 6-metil-mercaptopurina ribosídeo
(6-MMPr)**

Rio de Janeiro

2023

Manoella Santos de Borborema Fernandes

**Cinética na gravidez e passagem transplacentária da 6-metil-mercaptopurina ribosídeo
(6-MMPr)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: toxicologia ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten.

Rio de Janeiro

2023

Título do trabalho em inglês: Kinetics in pregnancy and transplacental passage of 6-methyl-mercaptopurine riboside (6-MMPr).

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

F363c Fernandes, Manoella Santos de Borborema.
Cinética na gravidez e passagem transplacentária da 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMPr) / Manoella Santos de Borborema Fernandes. -- 2023.
86 f. : il.color, fotos.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.
Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.
Bibliografia: f. 77-80.

1. Cromatografia. 2. Farmacocinética. 3. Azatioprina. 4. 6-Metil-Mercaptopurina Ribosídeo. 5. CLUE/EM. I. Título.

CDD 615.7924

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348
Biblioteca de Saúde Pública

Manoella Santos de Borborema Fernandes

**Cinética na gravidez e passagem transplacentária da 6-metil-mercaptopurina ribosídeo
(6-MMPr)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: toxicologia ambiental.

Aprovada em: 01 de setembro de 2023

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Gabriela Rodrigues de Souza
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof.^a Dra. Katia Soares da Poça
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Maria Regina Gomes Carneiro
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Isabella Fernandes Delgado
Fundação Oswaldo Cruz – Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade e misericórdia, por ser a minha fonte inesgotável de amor e esperança, por me dar sabedoria e me fortalecer até aqui.

Agradeço também a minha família que sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado, tornando essa caminhada mais leve.

Ao Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten pela orientação, pela confiança em meu potencial e por ajudar a tornar esse momento real.

A todo grupo do Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelos mais de 10 anos de trabalho em equipe e espírito de família, especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten, à Hellen Leal e à Rosângela Carvalho por toda ajuda e incentivo que me deram.

A toda equipe da Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais (DPNA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela colaboração, me acolhendo quando eu mais precisei. Um agradecimento especial ao Marcos, à Simony e à Aline por todo suporte e ajuda que me deram.

RESUMO

Foi descrito que a 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMPr), produto do metabolismo das tiopurinas azatioprina (AZA) e 6-mercaptopurina (6-MP), bloqueou a replicação do ZIK-V em células neurais e mostrou ser um forte candidato a medicamento antiviral para o tratamento desta infecção. A recente descoberta da atividade antiviral da 6-MMPr tem colocado este nucleosídeo em evidência e impulsionado o interesse em obter mais dados sobre o seu potencial farmacológico e toxicológico. Muito se especula sobre a inexistência de evidência de que esse nucleosídeo passe através da placenta humana ou de roedores. No intuito de esclarecer essa hipótese, esse estudo experimental tratou animais com a 6-MMPr pela primeira vez, para investigar a cinética do nucleosídeo *in vivo*, através da análise por CLUE/EM do sangue do animal tratado em dose única coletado em tempos subsequentes, e a passagem transplacentária do nucleosídeo, através da análise por CLUE/EM do sangue dos fetos de mãe tratada em dose única. Esse estudo, desenvolveu e validou uma metodologia analítica para analisar satisfatoriamente a 6-MMPr e a sua forma hidrolizada 6-metil-mercaptopurina (6-MMP). O método inédito de extração por precipitação de proteínas desenvolvido para a 6-MMPr e 6-MMP assegurou recuperar satisfatoriamente os analitos íntegros nas matrizes plasma e concentrado (papa) de hemácias, bem como o método analítico desenvolvido demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato e sensível, com limites de detecção e quantificação satisfatórios. As análises dos sangues dos animais tratados para construção da curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMPr ao longo do tempo mostrou diferença no perfil da curva cinética de ratas grávidas e não grávidas. Enquanto, nas ratas grávidas resultou em sinais do nucleosídeo apenas na matriz papa de hemácias a partir de 90 minutos pós-tratamento, apresentando pico de concentração em 180 minutos, nas ratas não grávidas resultou em sinais do nucleosídeo apenas na matriz papa de hemácias a partir de 210 minutos pós-tratamento, apresentando pico de concentração em 240 minutos. Os resultados também evidenciaram que não houve passagem transplacentária detectável do nucleosídeo em 120 e 1440 minutos após a mãe receber uma dose equivalente a 15 mg/kg, sugerindo que a 6-MMPr não é biodisponível no compartimento fetal e inviabilizando o seu uso como antiviral no tratamento de infecções por vírus Zika.

Palavras-chave: tiopurinas; 6-metil-mercaptopurina ribosídeo; cromatografia; CLUE/EM; farmacocinética.

ABSTRACT

It has been described that 6-methyl-mercaptopurine riboside (6-MMP_r), a product of the metabolism of the thiopurines azathioprine (AZA) and 6-mercaptopurine (6-MP), inhibited the replication of ZIKV in neural cells and proved to be a strong candidate as an antiviral drug for the treatment of this infection. The recent discovery of the antiviral activity of 6-MMP_r has brought this nucleoside to the forefront and sparked interest in obtaining more data on its pharmacological and toxicological potential. Much speculation exists regarding the lack of evidence that this nucleoside passes through the human or rodent placenta. In order to clarify this hypothesis, this experimental study treated animals with 6-MMP_r for the first time to investigate the *in vivo* nucleoside kinetics, as analyzed by CLUE/EM in blood samples collected at subsequent time points from animals treated with a single dose, and the transplacental passage of the nucleoside, as determined by CLUE/EM analysis of fetal blood from mothers treated with a single dose. This study developed and validated an analytical methodology for the satisfactory analysis of 6-MMP_r and its hydrolyzed form, 6-methyl-mercaptopurine (6-MMP). The novel protein precipitation extraction method developed for 6-MMP_r and 6-MMP ensured the satisfactory recovery of intact analytes in plasma and red blood cell concentrates, and the analytical method developed was found to be selective, linear, precise, accurate, and sensitive, with satisfactory detection and quantification limits. The analysis of blood samples from treated animals to construct the curve of changes in 6-MMP_r blood levels over time showed differences in the kinetic profile between pregnant and non-pregnant rats. In pregnant rats, signs of the nucleoside were observed only in the red blood cell concentrate matrix starting 90 minutes post-treatment, with a peak concentration at 180 minutes. In non-pregnant rats, signs of the nucleoside were observed only in the red blood cell concentrate matrix starting 210 minutes post-treatment, with a peak concentration at 240 minutes. The results also indicated that there was no detectable transplacental passage of the nucleoside at 120 and 1440 minutes after the mother received a dose equivalent to 15 mg/kg, suggesting that 6-MMP_r is not bioavailable in the fetal compartment and precluding its use as an antiviral in the treatment of Zika virus infections.

Keywords: thiopurines; 6-methyl-mercaptopurine riboside; chromatography; CLUE/EM; pharmacokinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metabolismo das tiopurinas.....	24
Figura 2 -	Moléculas de 6-MMP _r , 6-MMP E 6-MP.....	25
Figura 3 -	Resumo experimental.....	30
Figura 4 -	Amostra extraída.....	35
Figura 5 -	Método de extração 6-MMP _r nas matrizes plasma e papa de hemácias.....	36
Figura 6 -	CLUE/EM utilizado nesse estudo em colaboração com o DPNA-UFRJ.....	37
Figura 7 -	Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MP por CLUE/EM.....	41
Figura 8 -	Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MMP por CLUE/EM.....	42
Figura 9 -	Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MMP _r por CLUE/EM.....	43
Figura 10 -	Cromatogramas demonstrando especificidade e seletividade da 6-MMP _r	45
Figura 11 -	Diluições seriadas da curva analítica.....	46
Figura 12 -	Curva analítica da 6-MMP _r em metanol.....	47
Figura 13 -	Curva analítica da 6-MMP _r em plasma.....	48
Figura 14 -	Curva analítica da 6-MMP _r em papa de hemácias.....	48
Figura 15 -	Cromatogramas referentes ao limite de detecção e quantificação da 6-MMP _r , respectivamente.....	51
Figura 16 -	Cromatogramas demonstrando especificidade e seletividade da 6-MMP.....	53
Figura 17 -	Curva analítica da 6-MMP em metanol.....	55
Figura 18 -	Curva analítica da 6-MMP em plasma.....	55
Figura 19 -	Curva analítica da 6-MMP em papa de hemácias.....	56
Figura 20 -	Cromatogramas referentes ao limite de detecção e quantificação da 6-MMP, respectivamente.....	58
Figura 21 -	Estabilidade dos padrões 6-MMP e 6-MMP _r em solução (metanol).....	59

Figura 22 - Cromatogramas referentes aos resultados de estabilidade do padrão 6-MMP _r em solução (metanol).....	60
Figura 23 - Cromatogramas referentes aos resultados de estabilidade do padrão 6-MMP em solução (metanol).....	61
Figura 24 - Processo de incubação da 6-MMP _r <i>in vitro</i>	62
Figura 25 - Cromatogramas referentes aos resultados da incubação da 6-MMP _r <i>in vitro</i>	63
Figura 26 - Cromatogramas referentes às amostras branco plasma, branco papa de hemácias e branco metanol, respectivamente.....	64
Figura 27 - Cromatograma referente ao ponto 180 minutos pós-tratamento com 6-MMP _r de rata grávida (G2).....	65
Figura 28 - Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP _r ao longo do tempo em ratas grávidas (G2).....	66
Figura 29 - Cromatograma referente ao ponto 240 minutos pós-tratamento com 6-MMP _r de rata não grávida (G1).....	67
Figura 30 - Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP _r ao longo do tempo em ratas não grávidas (G1).....	67
Figura 31 - Cromatogramas referentes às matrizes plasma, papa de hemácias e líquido amniótico de fetos coletados após 120 minutos do tratamento da mãe com 6-MMP _r	68
Figura 32 - Cromatogramas referentes às matrizes plasma, papa de hemácias e líquido amniótico de fetos coletados após 1440 minutos do tratamento da mãe com 6-MMP _r	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Método analítico desenvolvido para análise da 6-MMP _r , 6-MMP e 6-MP.....	38
Tabela 2 -	Dados obtidos pela análise por CLUE-IES-EM em modo de monitoramento “ <i>full scan</i> ”.....;	40
Tabela 3 -	Tempo de retenção e área da 6-MMP _r nas matrizes metanol, plasma e papa de hemácias.....	44
Tabela 4 -	Valores de <i>p</i> / Efeito de matriz da 6-MMP _r	47
Tabela 5 -	Precisão do método analítico para a 6-MMP _r	49
Tabela 6 -	Exatidão / Recuperação do método analítico para a 6-MMP _r	50
Tabela 7 -	Tempo de retenção e área da 6-MMP nas matrizes metanol, plasma e papa de hemácias.....	52
Tabela 8 -	Valores de <i>p</i> / Efeito de matriz da 6-MMP.....	54
Tabela 9 -	Precisão do método analítico para a 6-MMP.....	56
Tabela 10 -	Exatidão / Recuperação do método analítico para a 6-MMP.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
AZA	Azatioprina
BHE	Barreira hematoencefálica
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CL	<i>Clearance</i>
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Depuração
DPR	Desvio padrão relativo
°C	Grau Celsius
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GMPS	Monofosfato de guanosina sintase
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
IMPDH	Monofosfato de inosina desidrogenase
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
H ₂ O	Água ultrapura
IES	<i>Ionização por eletrospray</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
kV	Quilovolt
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MTIMP	Monofosfato de metil-tioinosina
EM	Espectrometria de massas
(<i>m/z</i>)	Relação massa/carga

NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
OX	Xantina oxidase
RAC-1	Proteína sinalizadora
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
SIM	<i>Select ion monitoring</i>
SNC	Sistema nervoso central
(s/n)	Relação sinal/ruído
TA	Ácido tiúrico
TGMP	Monofosfato de 6-tioguanosina
TGDP	Difosfato de 6-tioguanosina
TGTP	Trifosfato de 6-tioguanosina
Thio-dGMP	Monofosfato de 6-tiodesoxiguanosina
Thio-dGDP	Difosfato de 6-tiodesoxiguanosina
Thio-dGTP	Trifosfato de 6-tiodesoxiguanosina
TIMP	Monofosfato de tioinosina
TPMT	Tiopurina metiltransferase
TXMP	Monofosfato de tioxantina
UA	Unidade arbitrária
CLUE	Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência
V	Volt
VD	Volume de distribuição aparente
ZIK-V	Zika vírus
5-NT2	5' nucleotidase II
6-MP	6-mercaptopurina
6-MMP	6-metil-mercaptopurina
6-MMPr	6-metil-mercaptopurina ribosídeo
6-MTIMP	6-metil-tioinosinamofosfato
6-TG	6-tioguanina
6-MTG	6-metil-tioguanina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	REAGENTES.....	31
4.3	ANIMAIS.....	31
4.4	ACASALAMENTO E GRAVIDEZ.....	32
4.5	TRATAMENTO.....	32
4.5.1	Preparo de solução 6-MMP_r em salina.....	32
4.6	COLETA DO SANGUE PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA CINÉTICA..	33
4.7	CESÁREA E COLETA DO SANGUE DOS FETOS.....	33
4.8	SEPARAÇÃO DAS MATRIZES PLASMA E CONCENTRADO (PAPA) DE HEMÁCIAS.....	33
4.9	MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	34
4.10	MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	37
4.10.1	Validação da metodologia analítica.....	39
4.10.2	Teste de estabilidade dos padrões.....	39
4.10.3	Preparo e armazenagem de soluções.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMP _r , 6-MMP E 6-MP POR CLUE/EM.....	40
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMP _r	44
5.2.1	Especificidade / Seletividade.....	44
5.2.2	Linearidade / Sensibilidade.....	46
5.2.3	Precisão.....	49
5.2.4	Exatidão e Recuperação.....	49
5.2.5	Limites de detecção e quantificação.....	50
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMP.....	52
5.3.1	Especificidade / Seletividade.....	52
5.3.2	Linearidade / Sensibilidade.....	54

5.3.3	Precisão.....	56
5.3.4	Exatidão e Recuperação.....	57
5.3.5	Limites de detecção e quantificação.....	57
5.4	ESTABILIDADE DOS PADRÕES 6-MMP E 6-MMPR.....	59
5.5	CINÉTICA DA 6-MMPR: CURVA DAS ALTERAÇÕES DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS AO LONGO DO TEMPO.....	62
5.6	PASSAGEM TRANSPLACENTÁRIA DA 6-MMPR.....	68
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A – FIGURA DA 6-MMPR DETALHADA QUIMICAMENTE.....	81
	APÊNDICE B – CROMATOGRAMA AMPLIADO DA 6-MMPR EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO 0,5 MG/ML.....	82
	APÊNDICE C – CROMATOGRAMA AMPLIADO DA 6-MMP EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO 0,5 MG/ML.....	83
	APÊNDICE D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DESENVOLVIDO NESSE ESTUDO.....	84

1 INTRODUÇÃO

i. CONCEITOS EM TOXICOLOGIA

“A Toxicologia, uma ciência multidisciplinar, investiga os toxicantes sob vários aspectos, desde sua natureza, métodos de detecção, até os efeitos que causam em seres vivos. Portanto, é indiscutível a sua importância no contexto atual da Saúde Pública.” (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008, p. 8).

A toxicologia é a ciência que estuda a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos nocivos à saúde humana, animal e ambiental provocados pela exposição a uma substância química, com a finalidade de prevenção, diagnóstico e tratamento da intoxicação. A Toxicologia abrange distintas áreas de conhecimento de acordo com o fenômeno toxicológico, sendo subdividida em áreas de atuação, entre elas estão a toxicologia analítica e a toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018).

Um agente tóxico ou toxicante é qualquer substância química capaz de provocar um efeito nocivo a um sistema biológico. Essa capacidade é definida como toxicidade, que assim como a intensidade do efeito, depende principalmente de (1) fatores relacionados às propriedades físico-químicas do toxicante – solubilidade, grau de ionização, coeficiente de partição óleo/água, pKa, tamanho molecular, estado físico e etc, que estão diretamente relacionadas ao comportamento toxicocinético; (2) fatores relacionados ao organismo – genética, imunidade, polimorfismos enzimáticos, idade, sexo, peso corpóreo, estado nutricional, estado hormonal, estado emocional, estado de saúde e etc; e (3) fatores relacionados às condições de exposição – via de introdução/administração, dose/concentração, frequência e duração da exposição e etc (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018).

A intoxicação é um processo patológico provocado pela manifestação dos efeitos nocivos após exposição a uma substância química, caracterizado pelo desequilíbrio fisiológico e evidenciado por sinais e sintomas clínicos. Existe uma série de processos envolvidos desde o contato da substância com organismo até o sintoma clínico. Sendo assim, o processo de intoxicação é dividido em quatro fases:

- (1) fase de exposição – correspondente ao contato do toxicante com o organismo. É importante considerar que nessa fase a dose/concentração, a via de introdução/administração, a frequência e a duração da exposição, as propriedades físico-químicas do toxicante, e a susceptibilidade do organismo estão diretamente

relacionadas com a disponibilidade química do toxicante para a absorção;

- (2) fase de toxicocinética – correspondente ao movimento do toxicante no organismo. Esta fase inclui todos os processos envolvidos na relação entre a disponibilidade química do toxicante e sua concentração nos diferentes tecidos do organismo. Esses processos são conhecidos como absorção, distribuição, biotransformação e excreção. É importante considerar que as propriedades físico-químicas do toxicante determinam o comportamento toxicocinético (biodisponibilidade, ligação à proteínas plasmáticas, grau de acesso aos órgãos-alvo, velocidade de eliminação e etc);
- (3) fase de toxicodinâmica – correspondente à ação do toxicante no organismo. Essa fase compreende a interação entre o toxicante ou seu produto biotransformado e sítios específicos do organismo, promovendo alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais;
- (4) fase clínica – correspondente à manifestação clínica dos efeitos resultantes da ação tóxica (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

Segundo a toxicologia, toda substância química é capaz de provocar um efeito nocivo dependendo das condições de exposição. Já dizia Paracelsus: *“Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose certa diferencia o remédio do veneno”*. Ou seja, para toda substância química existe um limite máximo de exposição que é seguro à saúde humana. Se esse limite máximo não puder ser definido, a exposição não é segura e, portanto, deve ser evitada (Passagli, 2018).

A janela terapêutica (margem de segurança) é a faixa de doses (concentrações) de um fármaco que produz uma resposta terapêutica, sem apresentar toxicidade. Quando abaixo, não há resposta terapêutica, quando acima apresenta toxicidade. A dose / concentração necessária para produzir efeito farmacológico ou toxicológico varia dependendo de diversos fatores. Para a compreensão da janela terapêutica de um fármaco é preciso o conhecimento da farmacocinética do agente químico, considerando as diferentes vias de exposição (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008).

ii. FARMACOCINÉTICA/TOXICOCINÉTICA

O conhecimento do comportamento farmacocinético e toxicocinético das substâncias em animais e seres humanos é fundamental para o desenvolvimento de fármacos, não só para compreender os dados pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos, como também para

decidir o regime de administração nos estudos clínicos de eficácia e segurança (Rang *et al.*, 2016).

A farmacocinética / toxicocinética é um ramo essencial para o estudo da farmacologia/toxicologia, pois permite avaliar matematicamente o movimento do agente químico no organismo. Inclui todos os processos envolvidos na relação entre a disponibilidade química da substância (fração total) e sua concentração nos diferentes tecidos do organismo (fração absorvida, fração distribuída, fração ligada e fração disponível no sítio molecular de ação / biodisponibilidade). Esses processos são conhecidos como absorção, distribuição, biotransformação e excreção (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

A absorção compreende o processo de passagem de uma substância do local de contato para a circulação sistêmica. Está diretamente relacionada com a capacidade da substância de ultrapassar membranas celulares, podendo ser por diferentes mecanismos. Esta capacidade e o mecanismo de passagem são influenciados pelo perfil físico-químico da molécula. Moléculas pequenas e com um maior caráter lipossolúvel possuem maior facilidade de permear as membranas celulares. A velocidade de absorção irá depender da via de introdução/administração e do mecanismo de passagem (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

Uma vez na corrente sanguínea, entende-se por distribuição a localização e concentração da substância em diferentes tecidos do organismo. A velocidade e a extensão da distribuição dependerão principalmente do fluxo sanguíneo e linfático nos diferentes tecidos e das características físico-químicas do agente químico. Para alcançar o sítio de ação a substância deve estar em estado molecular lipossolúvel e não ligada à proteínas plasmáticas; a porção livre é a que constitui a forma ativa. Uma extensa ligação proteica retarda a eliminação da substância (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

O volume de distribuição aparente (VD) é o parâmetro que indica a extensão teórica da distribuição de uma substância. É a relação da quantidade do agente químico administrada com a sua concentração plasmática (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Rang *et al.*, 2016).

A eliminação representa a exclusão irreversível do agente químico do organismo, que ocorre por meio de dois processos: biotransformação e excreção. A biotransformação é o conjunto de alterações que uma substância sofre no organismo, visando aumentar a sua polaridade e facilitar a sua excreção. Consiste em anabolismo e catabolismo; isto é, de construção (conjugação) e degradação (oxidação, redução, hidrólise) de substâncias por ação enzimática. O resultado da biotransformação pode ser a inativação completa ou parcial dos

efeitos do agente químico e a produção de metabólitos ativos substância (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

O *clerance* (CL) ou depuração (DP) é o parâmetro farmacocinético / toxicocinético que descreve a taxa de eliminação de substâncias do plasma em função do tempo. Quanto maior for o CL maior é a eliminação substância (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

A excreção, por sua vez, consiste na saída do agente químico e dos seus metabólitos do organismo, podendo ser através de excreções (urina, fezes, catarro), secreções (bile, suor, lágrima, saliva, leite) ou do ar expirado (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

O termo biodisponibilidade se refere ao percentual de aproveitamento de uma substância pelo organismo. É usado para indicar a fração da dose total que adentra a circulação sistêmica e alcança o sítio de ação, levando em consideração a capacidade de permeabilidade da molécula e a degradação enzimática sofrida durante todo processo até o sítio de ação (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Passagli, 2018; Rang *et al.*, 2016).

iii. TOXICOLOGIA ANALÍTICA

A toxicologia analítica é o campo da toxicologia que fornece evidências objetivas da natureza e magnitude da exposição a um composto, através da detecção, identificação e quantificação de substâncias ou de parâmetros bioquímicos relacionados à intoxicação em amostras biológicas, ambientais ou outras relevantes, por meio de técnicas analíticas (Moreau & Siqueira, 2016).

A cromatografia em coluna é a principal técnica analítica empregada em análises farmacológicas e toxicológicas. É uma técnica físico-química de separação baseada na migração diferencial dos compostos de uma mistura, que ocorre em razão das diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. Dependendo da natureza da fase móvel, pode ser classificada em cromatografia em fase líquida, em fase gasosa e supercrítica. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias é o que torna essa técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, necessita de uma técnica confirmatória, podendo ser associada a um detector ou a outras técnicas que permitam detectar, identificar e determinar a proporção de cada substância presente em uma mistura (Skoog *et al.*, 2002; Lanças, 2009, 2013, 2019).

Na segunda metade do Século XX, o desenvolvimento de técnicas modernas de

separação, purificação e análise, tais como, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), se consolidou no Brasil e no mundo. Em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes, o avanço mais recente das técnicas de separação, a cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (CLUE) desenvolveu-se baseada nos mesmos princípios do CLAE, porém este equipamento utiliza fases estacionárias com partículas menores e permite operar em altas pressões, o que aumenta a resolução, diminui o tempo das análises e gera menores quantidades de resíduos, atendendo aos apelos da Química Verde (Marston, 2007; Maldaner & Jardim, 2012).

A CLUE é frequentemente acoplada à espectrometria de massas (EM), técnica que mede a relação massa/carga (m/z) de íons produzidos por algum método de ionização e é reconhecido por sua alta sensibilidade, versatilidade e universalidade. Por esse motivo, o CLUE/EM oferece um ótimo desempenho por permitir uma excelente resolução cromatográfica e uma sensibilidade muito superior a outros métodos confirmatórios, proporcionando resultados de alta qualidade. Por mais de um século, a espectrometria de massas operou isoladamente até juntar-se à técnica de cromatografia e formarem a mais eficiente ferramenta para análise quantitativa de espécies químicas. Essa combinação permitiu que diversos desafios nas áreas da ciência, saúde pública e ambiental fossem vencidos (Lanças, 2009, 2013, 2019; Kumar *et al.*, 2012).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas quanto ao sistema cromatográfico, ao objetivo da separação, a fase móvel, a fase estacionária e pelo tipo de separação. Em se tratando deste último, na CLAE e CLUE as substâncias são separadas, na maioria das vezes, por adsorção, processo baseado na adesão de moléculas de um fluido (o adsorvido) a uma superfície sólida (o adsorvente) através de interações físico-químicas, podendo ser de fase normal, quando a fase móvel é apolar e a fase estacionária polar, ou de fase inversa, quando a fase móvel é polar e a fase estacionária apolar. Em geral, esses equipamentos são compostos por um reservatório de solventes, um sistema de bombeamento, um sistema de introdução de amostra, uma coluna cromatográfica e um detector interconectado a um monitor. A diferença entre eles está no sistema de bombeamento, onde a CLUE permite operar em pressões mais altas, resultando em altíssimas resoluções (Skoog *et al.*, 2002; Lanças, 2009, 2013, 2019).

A espectrometria de massas baseia-se na produção e separação de íons, provenientes de moléculas presentes em uma determinada amostra. Estes íons são produzidos por um método de ionização e separados em um analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), os quais têm posteriormente suas abundâncias relativas determinadas.

Basicamente, os espectrômetros de massas são compostos por um sistema de introdução de amostra, uma fonte de ionização, um acelerador de íon, um analisador de massas e um detector interconectado a um monitor. A técnica possui variações de acordo com os diferentes métodos de ionização e tipos de analisadores de massas, sendo este último o responsável por definir a sensibilidade da técnica. Em se tratando particularmente do analisador de massas do tipo armadilha de íons (*ion trap*), onde todos os íons gerados são confinados por campos elétricos em uma armadilha eletrostática, esse analisador tem sido cada vez mais utilizado em função, principalmente, da sua alta sensibilidade e taxa de escaneamento, e por permitir a realização de EM/EMn, ou seja, permite ionizar e fragmentar a molécula mais de duas vezes em uma mesma análise. Essa versatilidade torna esse analisador uma ferramenta eficiente para a caracterização detalhada de uma amostra. Porém, a armadilha de íons também possui limitações. Por ser altamente sensível, a relação sinal/ruído (s/n) é aumentada, e os íons armazenados podem interagir uns com os outros e interferir na precisão, sendo este método mais preciso em matrizes limpas e não-complexas (Skoog *et al.*, 2002; Lanças, 2009, 2013, 2019; Robinson *et al.*, 2005).

A combinação da cromatografia em fase líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massas, conhecida como CLUE/EM, pode ser vista como a fusão ideal entre técnicas de separação e detecção (Skoog *et al.*, 2002).

iv. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

É fundamental a comprovação da eficácia e confiabilidade dos métodos de ensaio através de evidência mensurável. Nesse sentido, a validação da metodologia analítica é um sistema de qualidade que garante que o método é confiável e adequado aos objetivos propostos (Moreau & Siqueira, 2016).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. Respectivamente, são as resoluções Anvisa, RE nº 899, de 29/05/2003; RDC nº 27, de 17/05/2012; RDC nº 166, de 24/07/2017 e o documento Inmetro DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8 (Moreau & Siqueira, 2016; Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

A metodologia será considerada validada, se avaliados os seguintes parâmetros de desempenho, quando aplicáveis: (1) Especificidade / Seletividade; (2) Linearidade / Sensibilidade; (3) Precisão; (4) Exatidão; (5) Recuperação; (6) Limite de detecção; (7) Limite

de quantificação; (8) Robustez. É desejável que a validação contemple todos os parâmetros, entretanto alguns podem ser opcionais dependendo da finalidade do ensaio. Todavia, uma validação parcial deve avaliar, pelo menos, os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

(1) Especificidade / Seletividade

A especificidade / seletividade mede a capacidade do método analítico de identificar e quantificar o analito de interesse, inequivocamente, mesmo na presença de interferentes, tais como impurezas, substâncias de degradação ou componentes da matriz (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

(2) Linearidade / Sensibilidade

A linearidade mede a capacidade do método analítico de obter resultados proporcionais à concentração do analito de interesse na amostra. Essa medição é feita através de uma curva analítica contendo no mínimo 5 concentrações diferentes, cujo coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,990. A inclinação da curva analítica faz referência à sensibilidade, sendo o método mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

(3) Precisão

A precisão mede a capacidade do método analítico de obter resultados próximos. É expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária e/ou da reprodutibilidade, através do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

$$\boxed{CV = DPR = (DP / CMD) \times 100}$$

Sendo: DP – desvio padrão; CMD – concentração média determinada.

(4) Exatidão

A exatidão mede a capacidade do método analítico de obter resultados em concordância com o valor aceito como verdadeiro. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) e a concentração teórica correspondente (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

$$\text{Exatidão} = \text{valor observado} / \text{valor esperado} \times 100$$

(5) Recuperação

A recuperação / tendência mede a eficiência do processo de extração do método analítico, sendo expressa numericamente semelhante à exatidão. Admite-se uma recuperação entre 85% e 115%, desde que seja exata e precisa (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

$$\text{Recuperação} = \text{valor observado} / \text{valor esperado} \times 100$$

(6) Limite de detecção

O limite de detecção (LD) de um método analítico é a menor concentração detectável do analito na amostra. É determinado experimentalmente pela avaliação/percepção visual e/ou através da relação sinal/ruído, sendo aceitável uma relação de 3:1 (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

(7) Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor concentração quantificável do analito na amostra. É determinado experimentalmente pela avaliação/percepção visual e/ou através da relação sinal/ruído, sendo aceitável uma relação de 10:1 (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

(8) Robustez

Dentro dos estudos de validação, este é um parâmetro opcional, o qual mede a capacidade do método analítico de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, fornecendo um indicativo de confiabilidade do método durante as aplicações rotineiras (Inmetro, 2020; Anvisa, 2017).

v. TOXICOLOGIA REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

A pesquisa na área da toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento é importante para a atividade regulatória que a compreende, pois abrange o estudo sobre os riscos e perigos associados à exposição a substâncias tóxicas durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, estendendo-se até a puberdade, momento em que há a conclusão de todos os processos de desenvolvimento (Hood, 2012).

Teratologia é a ciência que estuda as causas, mecanismos e manifestações de desvios do desenvolvimento de natureza estrutural ou funcional. O termo teratogenicidade tem sido usado para significar a capacidade de produzir malformação que, por sua vez, é definida como uma mudança estrutural que pode afetar de forma negativa a sobrevivência, o desenvolvimento ou a função. O efeito teratogênico (teratogenicidade) pode ser resultado tanto da ação de substâncias tóxicas, quanto podem ser originárias de alterações genéticas e epigenéticas. A suscetibilidade à teratogênese varia com o estágio do desenvolvimento no momento da exposição e com a concentração disponível do toxicante no compartimento fetal (Hood, 2012; Wilson & Fraser, 1977).

A placenta, estrutura especializada que se desenvolve concomitantemente com o embrião, é constituída de várias camadas celulares interpostas entre a circulação materna e fetal. Vários fatores influenciam a passagem do agente químico para o compartimento fetal. A concentração total que chega ao concepto é o produto de um conjunto de variáveis, algumas relacionadas à capacidade funcional materna e outras relacionadas à natureza físico-química da própria substância, que define a capacidade e o modo de passagem transplacentária. A maioria das substâncias permeiam a barreira placentária através de difusão simples, mas algumas utilizam outros mecanismos. Embora um agente químico possua a capacidade de permear a placenta, a concentração da substância transferida para o concepto não é proporcional a dosagem recebida pela mãe. O organismo materno possui vários mecanismos homeostáticos que reduzem a concentração sanguínea disponível e livre para permear a

placenta (Wilson & Fraser, 1977; Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008).

vi. TIOPURINAS

As purinas (adenina e guanina) são bases nitrogenadas convertidas no organismo em nucleosídeos e nucleotídeos fundamentais para a síntese dos ácidos nucleicos. São sintetizadas como componentes de ribonucleotídeos para a síntese de RNA e de desoxirribonucleotídeos para a síntese de DNA, e para o metabolismo energético e sinalização química extracelular, através de derivados ATP, GTP, AMPc e GMPc. Em geral, as purinas são sintetizadas por duas vias: a síntese *de novo* e a via de recuperação. Enquanto a via *de novo* utiliza uma ribose com dois pirofosfatos e a glutamina, a via de recuperação utiliza as purinas provenientes dos alimentos (Golan *et al.*, 2009; Barreiros & Barreiros, 2012).

Os nucleosídeos são N-glicosídeos, nos quais um nitrogênio da pirimidina ou da purina está ligado ao carbono anomérico de um carboidrato (pentose). Os nucleotídeos são ésteres do ácido fosfórico dos nucleosídeos, isto é, o nucleotídeo é um nucleosídeo com o grupo 5'-OH ou 3'-OH ligado ao ácido fosfórico por meio de uma ligação éster (Barreiros & Barreiros, 2012).

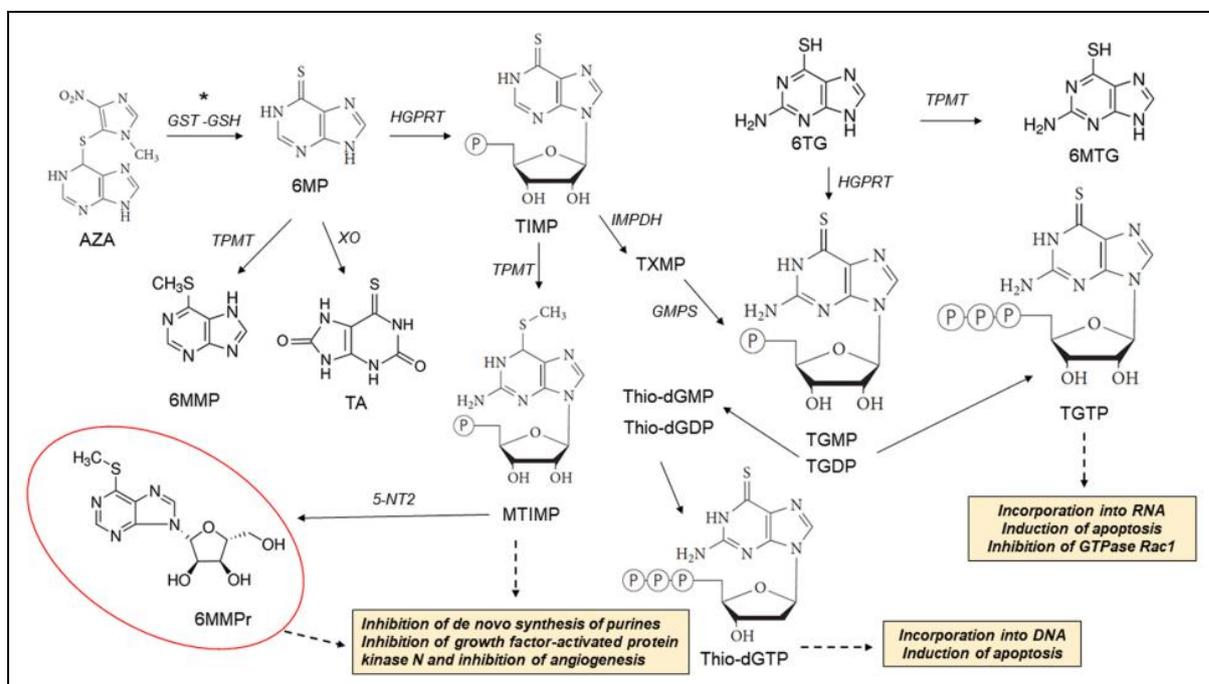
As tiopurinas são análogos sintéticos das purinas naturais, onde o átomo de oxigênio ou nitrogênio foi substituído por enxofre ou radical SH. São fármacos amplamente utilizados no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, bem como para o tratamento de doenças autoimunes e reumatológicas, doenças inflamatórias crônicas dos intestinos e como imunossupressores após transplantes, uma vez que atuam como antagonistas, interferindo nos processos bioquímicos envolvendo as purinas e resultando na inibição da síntese dos ácidos nucleicos e, portanto, em imunossupressão (Van Scoik *et al.*, 1985; Belizna *et al.*, 2020).

O preciso modo pelo qual as tiopurinas agem causando imunossupressão permanece em grande parte desconhecido. O mecanismo de ação é complexo e multifacetado, e parece incluir: (1) os bloqueios da replicação celular e da transcrição, através da sua incorporação ao DNA e ao RNA, respectivamente; (2) o bloqueio da transdução de sinais mediada pela proteína Rac-1; (3) efeito antimetabólico por meio da inibição da síntese de GTP pela 6-metil-tioinosinomonofosfato (6-MTIMP) (Tiede *et al.*, 2003).

Entre as tiopurinas frequentemente usadas na clínica, destacam-se os análogos de enxofre das purinas naturais: azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP) e 6-tioguanina (6-TG). Essas pró-drogas, após uma sequência de processos metabólicos complexos, são transformadas em nucleosídeos e nucleotídeos farmacologicamente ativos, como a 6-metil-

mercaptapurina ribosídeo (6-MMPr), destacada na figura 1 (Van Scoik *et al.*, 1985; Belizna *et al.*, 2020; Gomes-Carneiro *et al.*, 2022).

Figura 1 – Metabolismo das tiopurinas



Legenda: Vias metabólicas do pró-fármaco Azatioprina (AZA) que leva à formação de compostos farmacologicamente ativos. **Abreviaturas:** 6-mercaptopurina (6-MP), 6-metil-mercaptopurina (6-MMP), ácido tiúrico (TA), 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMPr), monofosfato de tiiosina (TIMP), monofosfato de metil-tiosina (MTIMP), monofosfato de tioxantina (TXMP), 6-tioguanina (6-TG), 6-metil-tioguanina (6-MTG), monofosfato de 6-tioguanosina (TGMP), difosfato de 6-tioguanosina (TGDP), trifosfato de 6-tioguanosina (TGTP), monofosfato de 6-tiodesoxiguanosina (Thio-dGMP), difosfato de 6-tiodesoxiguanosina (Thio-dGDP), trifosfato de 6-tiodesoxiguanosina (Thio-dGTP), glutatona S-transferase (GST), glutatona (GSH), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), tiopurina metiltransferase (TPMT), xantina oxidase (OX), 5'nucleotidase II (5-NT2), monofosfato de inosina desidrogenase (IMPDH), monofosfato de guanosina sintase (GMPS), *conversão não enzimática. **Fonte:** Gomes-Carneiro *et al.* (2022).

As tiopurinas possuem uma janela terapêutica (margem de segurança) relativamente estreita e efeitos adversos como mielossupressão, hepatotoxicidade, pancreatite e intolerância gastrointestinal, sendo a principal causa da interrupção do tratamento. A principal via de inativação das tiopurinas é catalisada pela enzima citoplasmática geneticamente polimórfica tiopurina metiltransferase (TPMT). A atividade da TPMT e consequentemente a concentração de metabólitos inativos estão diretamente relacionadas ao polimorfismo genético, o que pode explicar parcialmente as variações nas respostas clínicas dos pacientes. O regime de tratamento padrão em pacientes que pertencem à subpopulação deficiente em TPMT, assim como a coadministração com drogas que inibem a TPMT, pode resultar no acúmulo de metabólitos ativos e no aumento da toxicidade durante o tratamento, sendo essa enzima um

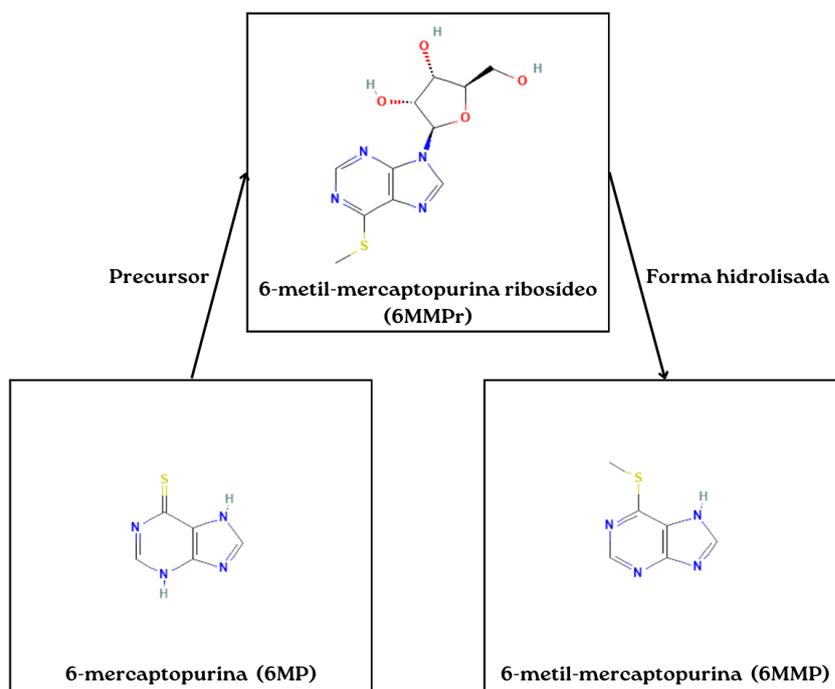
dos principais determinantes de toxicidade da tiopurina (Franca *et al.*, 2021; Gomes-Carneiro *et al.*, 2022).

vii. 6-METIL-MERCAPTOPURINA-RIBOSÍDEO (6-MMPR)

A 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMPr) [C₁₁H₁₄N₄O₄S], também conhecida como 6-metil-tio-inosina (C₁₁H₁₄N₄O₄S), é formada por uma purina, uma desoxirribose, um enxofre e uma metila. Pequenas diferenças estruturais diferem essa molécula do seu precursor 6-mercaptopurina (6-MP) [C₅H₄N₄S] e da sua forma hidrolisada 6-metil-mercaptopurina (6-MMP) [C₆H₆N₄S], como apresentado na figura 2 (Pubchem, 2023).

A 6-MMPr é um produto do metabolismo de AZA e 6-MP. Esse metabólito, ribosilado pela atividade da enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT) e S-metilado pela atividade da enzima TPMT, além de inibir a síntese *de novo* de purina, resultando no bloqueio da síntese de DNA e RNA e, conseqüentemente, em efeitos citotóxicos, tem sido associado à toxicidade hepática e leucopenia precoce durante o tratamento com AZA e 6-MP (Gomes-Carneiro *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2020).

Figura 2 – Moléculas de 6-MMPr, 6-MMP e 6-MP



Fonte: Adaptado de Pubchem (2023) pela autora.

A AZA, a 6-MP e, particularmente, o metabólito 6-MMPr possuem atividades antivirais potentes contra vários vírus de RNA em culturas celulares (*in vitro*) (HOOVER & STRIKER, 2008). Hoover & Striker (2008) demonstraram que a metilação do enxofre na posição 6 do anel purínico otimiza a atividade antiviral dos metabólitos de AZA e 6-MP contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em culturas de células. Enquanto a 6-MMP apresentou pouca atividade antiviral, a adição de um ribosídeo, formando a 6-MMPr, aumentou a atividade em 500x, tornando a 6-MMPr o metabólito mais ativo de AZA e 6-MP. Segundo os autores, o potencial de ação da 6-MMPr não se deve à um efeito celular-específico, mas sim à uma atividade vírus-específica, onde o metabólito interfere na ligação do RNA viral ao GTP no local de iniciação, reduzindo a replicação do material genético do vírus (Hoover & Striker, 2008).

Foi recentemente descrito que os nucleosídeos 2'-C-metilados exerceram atividade *in vitro* contra o Zika vírus (ZIK-V), um arbovírus cujo genoma é formado por RNA de fita simples, membro da família Flaviviridae e gênero Flavivirus. Em 2015, a doença surgiu no Brasil como emergência em Saúde Pública e foi associada ao grande aumento na incidência de casos de microcefalia em bebês nascidos de mães infectadas durante a gestação. Dada a urgência em desenvolver abordagens terapêuticas contra infecções por ZIK-V, De Carvalho *et al.* (2017) avaliaram a atividade da 6-MMPr *in vitro* em células neurais contra a cepa epidêmica de ZIK-V e concluíram que o nucleosídeo, por bloquear a replicação do vírus, é um forte candidato a medicamento antiviral para o tratamento desta infecção. Os autores salientam que não há dados precisos sobre a biodisponibilidade da 6-MMPr e especulam que se a permeabilidade do nucleosídeo for um fator impeditivo, modificações químicas poderiam contornar esse problema (Eyer *et al.*, 2016; De Carvalho *et al.*, 2017).

Todavia, Gomes-Carneiro *et al.* (2022) descreveram que a 6-MMPr apesar de ter exibido elevada toxicidade para o organismo materno em ratos, aparentemente, não atingiu o compartimento embrionário e fetal. Doses únicas de 6-MMPr administradas no meio do período de organogênese não foram embriotóxicas ou teratogênicas para ratos, o que contrasta com a molécula precursora (6-MP), que apresentou potente efeito embriofetal e teratogênico. Segundo os autores, até o momento, não há evidência direta de que a 6-MMPr seja um substrato para transportadores de nucleosídeos placentários, assim como não há qualquer evidência de que a molécula seja biodisponível no compartimento embrionário e fetal de humanos ou roedores. Além disso, os autores salientam que o desenvolvimento da 6-MMPr como potencial medicamento antiviral para tratamento de mulheres grávidas infectadas com o vírus Zika parece altamente improvável (Gomes-Carneiro *et al.*, 2022).

Os achados de Gomes-Carneiro *et al.* (2022) corroboram com os achados de Neubert *et al.* (1977), os quais descreveram que doses de até 60 mg/kg de 6-MMP_r, administradas por via subcutânea, não induziram malformações nas proles de camundongos (*in vivo*). Do contrário, quando testada em meio de cultura de órgãos (*ex vivo*) observaram teratogenicidade concentração-dependente, sugerindo que a 6-MMP_r, quando administrada em fêmeas grávidas de camundongos, é pouco biodisponível (ou nem mesmo o é) para o embrião/feto (Neubert *et al.*, 1977; Gomes-Carneiro *et al.*, 2022).

Ainda, segundo Lim *et al.* (2011), apesar de ser um potente inibidor de flavivírus em cultura de células, a 6-MMP_r não foi eficaz contra a doença do Nilo Ocidental em camundongos, sugerindo que a 6-MMP_r possui baixa biodisponibilidade no SNC (Lim *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A recente descoberta da atividade antiviral da 6-MMPr tem colocado este nucleosídeo em evidência e impulsionado o interesse em obter mais dados sobre o seu potencial farmacológico e toxicológico, uma vez que esses dados são escassos ou inexistentes, como, por exemplo, a inexistência de dados sobre a cinética da 6-MMPr *in vivo*. Sendo o conhecimento da farmacocinética / toxicocinética de um agente químico fundamental para o desenvolvimento de fármacos, não só para compreender os dados pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos, como também para, futuramente, decidir o regime de administração nos estudos clínicos de eficácia e segurança.

Sabemos que um medicamento antiviral eficaz para combater infecções por ZIK-V deve ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e inibir o vírus, assim como, em gestantes, também deve ser capaz de atravessar a barreira placentária e impedir a replicação do vírus no tecido nervoso do conceito sem apresentar toxicidade para o organismo materno e fetal. Somente se a atividade antiviral e a embriotoxicidade não compartilharem um mecanismo comum seria viável desenvolver agentes antivirais derivados de 6-MMPr eficazes e seguros.

Dados experimentais recentes do nosso laboratório (Gomes-Carneiro *et al.* [2022]) não evidenciaram efeitos embriotóxicos ou teratogênicos significativos após a exposição das grávidas à 6-MMPr por via subcutânea em ratos, apesar do nucleosídeo ter provocado elevada toxicidade para o organismo materno. O que corrobora com a hipótese de que não há passagem transplacentária desse nucleosídeo, inviabilizando o seu potencial uso como medicamento antiviral para tratamento de mulheres grávidas infectadas com o ZIK-V. Entretanto, segundo os autores, é preciso testar essa hipótese a partir de evidências diretas obtidas em estudos analíticos que incluam dados sobre a cinética e biodisponibilidade da 6-MMPr no compartimento embrionário e fetal. Sendo assim, o presente estudo pode ser compreendido como complementar ao estudo de Gomes-Carneiro *et al.* (2022).

Muito se especula sobre a inexistência de evidência de que esse nucleosídeo passe através da placenta humana ou de roedores, mas, ao que sabemos, nenhum estudo até hoje avaliou a cinética e a biodisponibilidade da 6-MMPr quando administrada *in vivo*. Embora as evidências até o momento sugiram que não há ou há pouca passagem transplacentária, faz-se necessário confirmar essa hipótese de forma direta, avaliando a cinética da 6-MMPr (curva das alterações dos níveis sanguíneos [plasmáticos e eritrocitários] do nucleosídeo ao longo do tempo), incluindo dados sobre passagem transplacentária (fração biodisponível no

compartimento embrionário e fetal). Uma vez desenvolvido, o método analítico para a 6-MMPr com adaptações também será útil para investigar a passagem pela BHE posteriormente, assim como ser utilizado para o monitoramento dos metabólitos S-metilados de AZA e 6-MP, uma vez que a toxicidade de AZA e 6MP demonstra ser dose-dependente das concentrações de seus metabólitos.

3 OBJETIVOS

i. OBJETIVO GERAL

Investigar em que medida a 6-MMP_r alcança o compartimento fetal, como também, o curso temporal da eliminação da 6-MMP_r, quando administrada por via subcutânea em ratas grávidas ao final da gravidez.

ii. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver método satisfatório de extração da 6-MMP_r e 6-MMP nas matrizes plasma e papa de hemácias;
- ✓ Desenvolver método satisfatório de análise da 6-MMP_r e 6-MMP nas matrizes plasma e papa de hemácias por CLUE/EM;
- ✓ Validar o método analítico desenvolvido para analisar a 6-MMP_r e a 6-MMP nas matrizes plasma e papa de hemácias por CLUE/EM;
- ✓ Avaliar a estabilidade dos padrões 6-MMP_r e 6-MMP em solução (metanol);
- ✓ Avaliar a cinética (curva das alterações dos níveis sanguíneos [plasmáticos e eritrocitários] ao longo do tempo) da 6-MMP_r em ratos;
- ✓ Avaliar a passagem transplacentária (fração biodisponível no compartimento fetal) da 6-MMP_r em ratos;

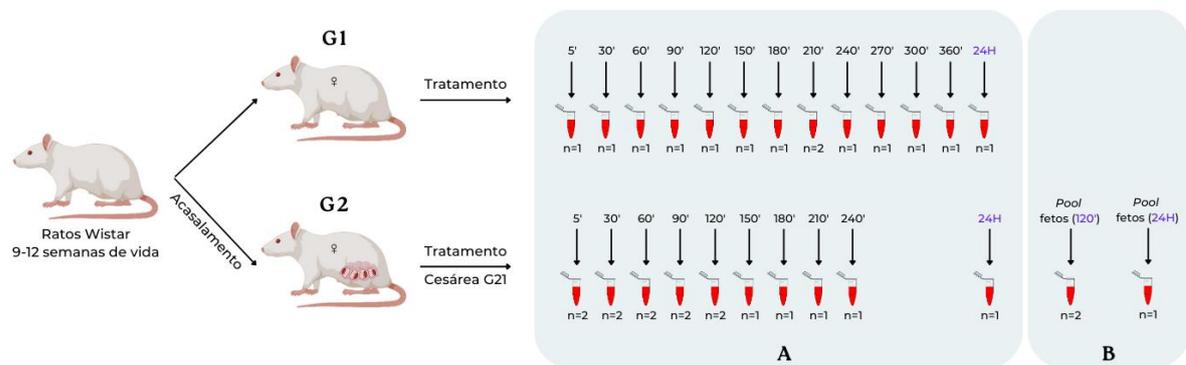
4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para este estudo experimental *in vivo* foi escolhido utilizar ratos Wistar em idade de reprodução. Essa linhagem heterogênica (*outbred*) é frequentemente utilizada em pesquisas biomédicas. Esses animais apresentam uma grande diversidade genética, possibilitando a reprodução de populações naturais.

Dois grupos foram constituídos: um grupo controle (G1[ratas não grávidas]) e um grupo experimental (G2 [ratas grávidas]). Os grupos se diferem apenas no parâmetro gravidez. Enquanto o grupo G1 é formado por não grávidas tratadas com 6-MMP_r, o grupo G2 é formado por grávidas tratadas com 6-MMP_r no 21º dia de gestação (GD 21), como apresentado na figura 3. Ao todo, seis ratas foram utilizadas, distribuídas em três por grupo, onde cada animal forneceu amostras de sangue correspondentes a 5 pontos da curva cinética.

Figura 3 – Resumo experimental



Legenda: A - amostras para avaliação da cinética da 6-MMP_r em ratas (grávida e não grávida). B - amostras para avaliação da passagem transplacentária da 6-MMP_r em ratas. G1 - grupo das não grávidas tratadas. G2 - grupos das grávidas tratadas. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Neste estudo, a cinética da 6MMP_r (curva das alterações dos níveis sanguíneos [plasmáticos e eritrocitários] ao longo do tempo) foi avaliado através da análise por CLUE/EM do sangue do animal tratado em dose única coletado em tempos subsequentes. O sangue foi separado formando duas matrizes: plasma e concentrado (papa) de hemácias, permitindo avaliar também a tendência de migração da 6-MMP_r no compartimento sanguíneo. A passagem transplacentária da 6-MMP_r foi avaliada através da análise por CLUE/EM do sangue dos fetos (GD 21) de mãe tratada em dose única. Para que as análises

por CLUE/EM fossem realizadas, foi preciso desenvolver e validar uma metodologia analítica para a 6-MMP_r e para a sua forma hidrolisada 6-MMP suficientemente sensível, precisa, exata, estável e capaz de recuperar satisfatoriamente os analitos nas matrizes.

4.2 REAGENTES

Esse estudo utilizou os seguintes reagentes:

- ✓ 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMP_r), pureza-HPLC: $\geq 99\%$, peso molecular 298,32 g/mol (Sigma-Aldrich®);
- ✓ 6-metil-mercaptopurina (6-MMP), pureza: $\geq 95\%$, peso molecular 166,20 g/mol (Toronto Research Chemicals®);
- ✓ 6-mercaptopurina monohidratada (6-MP), pureza-HPLC: $\geq 97.5\%$, peso molecular 170,19 g/mol (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Ditiotretitol, pureza-HPLC: $\geq 98\%$, peso molecular 154,25 g/mol (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Metanol, pureza-HPLC: $\geq 99,9\%$, peso molecular 32,04 g/mol (J.T.Baker®);
- ✓ Clorofórmio, pureza-CG: $\geq 99,8\%$, peso molecular 32,04 g/mol (Merck®);
- ✓ Hidróxido de Amônio, peso molecular 35,05 (Sigma-Aldrich®).

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar com idade entre 9-12 semanas de vida, comprados da Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ). Após o recebimento dos animais com 60 dias de vida, machos e fêmeas foram alojados individualmente em gaiolas standard, e mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), fotoperíodo (12 horas) e umidade relativa (70%).

A utilização e o manuseio dos ratos ocorreram de acordo com o disposto na legislação brasileira de proteção e bem-estar dos animais, e seguiram a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA). Essa diretriz nacional está alinhada com o contido no Guia para Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition*, 2011) publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ: Licença LW-10/19.

4.4 ACASALAMENTO DE GRAVIDEZ

Duas horas antes do término da fase escura do fotoperíodo, as ratas foram transferidas para a gaiola de macho sexualmente maduro e experiente, e permaneceram na presença do macho por duas horas. Findo o período de coabitação, as fêmeas foram retiradas da gaiola e examinadas para a presença de tampão vaginal (*plug*) e/ou para a presença de espermatozoides no lavado vaginal (confirmação da cópula).

Nos casos em que foi notado o *plug* e/ou a presença de espermatozoides no lavado vaginal, as fêmeas foram consideradas grávidas (sendo o dia da confirmação da cópula definido como o dia zero da gestação) e transferidas para gaiolas individuais, sendo identificadas como pertencentes ao grupo G2.

O mesmo protocolo de acasalamento foi repetido nos dias subsequentes até que fosse atingido o número pretendido de fêmeas grávidas para o grupo experimental. O peso das grávidas foi acompanhado semanalmente até o dia programado para a cesárea.

4.5 TRATAMENTO

As ratas de ambos os grupos (G1 e G2) foram tratadas por via subcutânea (pele sobre o pescoço) com uma solução recém preparada contendo 15 mg/kg de 6-MMP_r em salina 0,9%. O volume de injeção foi ajustado de acordo com o peso do animal, respeitando a dose final de 15 mg/kg e não excedendo o volume de 3 mL.

4.5.1 Preparo de solução 6-MMP_r em salina

A solução de 6-MMP_r utilizada no tratamento foi preparada em balão volumétrico de 10 mL usando solução salina 0,9% em uma concentração final de 3 mg/mL.

4.6 COLETA DO SANGUE PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA CINÉTICA

Após o tratamento em dose única, os intervalos de tempo selecionados para a coleta do sangue e construção da curva de alterações dos níveis plasmáticos ao longo do tempo em ratas

grávidas (G2) foram 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 1440 minutos, formando uma curva cinética de dez pontos. Os intervalos de tempo selecionados para a coleta do sangue e construção da curva de alterações dos níveis plasmáticos ao longo do tempo em ratas não grávidas (G1) foram 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360 e 1440 minutos, formando uma curva cinética de treze pontos.

Em cada ponto, aproximadamente 500 μL de sangue foram coletados em tubo tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL contendo 20 μL de anticoagulante heparina pela veia lateral da cauda do animal com auxílio de agulha heparinizada.

4.7 CESÁREA E COLETA DO SANGUE DOS FETOS

As cesáreas das ratas do grupo G2 foram realizadas, no 21º dia de gestação, após a coleta do sangue da mãe correspondente ao último ponto (120 e 1440 minutos após o tratamento). As mães foram eutanasiadas por decapitação após anestesia. Constatado o óbito, foi feita uma incisão na parede abdominal para retirada do útero gravídico e seu conteúdo. O útero gravídico foi pesado com todo o seu conteúdo e, posteriormente, aberto com cuidado. Antes da retirada dos fetos, foi coletado um *pool* de líquido amniótico, em seguida, os fetos foram retirados, limpos e eutanasiados por decapitação. Uma a duas gotas de sangue de cada feto foi coletada em tubo tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL contendo 20 μL de anticoagulante heparina para formação do *pool* de sangue.

4.8 SEPARAÇÃO DAS MATRIZES PLASMA E CONCENTRADO (PAPA) DE HEMÁCIAS

O sangue coletado foi centrifugado a 12.000 x g (RCF) por 15 minutos a temperatura ambiente para separação do plasma e do concentrado (papa) de hemácias. Após a centrifugação, o plasma foi cuidadosamente retirado e imediatamente armazenado a -20°C para ser analisado posteriormente. Após a retirada do plasma, com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 100 μL da papa de hemácias foi retirada do fundo do precipitado e ressuspendida em outro tubo contendo 300 μL de água ultrapura. A nova amostra foi agitada para promover a lise (rompimento) total das hemácias e liberação do analito, em seguida foi armazenada a -20°C para ser analisada posteriormente.

4.9 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Um método de extração único foi desenvolvido neste estudo para as matrizes plasma e papa de hemácias. O método foi pensado a fim de evitar uma possível degradação dos analitos durante o processo de extração, e assim garantir resultados confiáveis e reais.

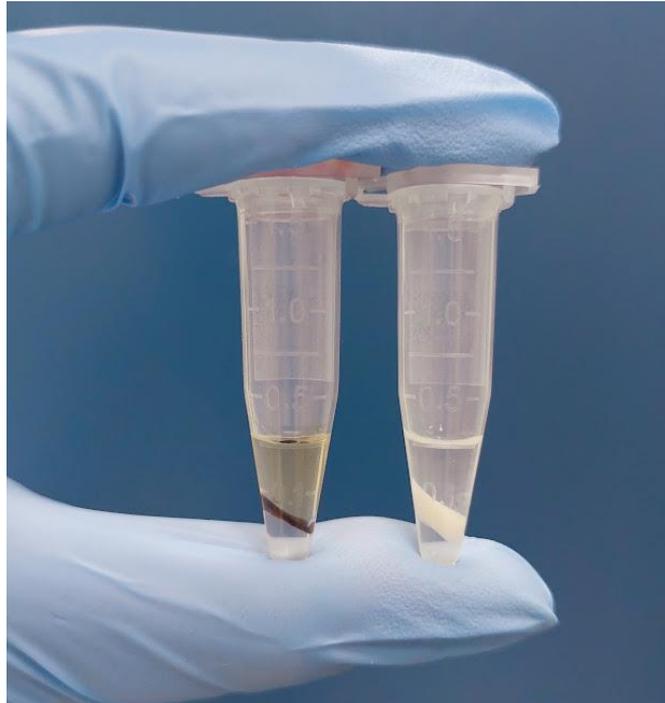
Ao contrário dos métodos descritos na literatura, neste método inédito, a não acidificação do meio, evita que ocorra a hidrólise química da 6-MMP_r, permitindo trabalhar com o analito íntegro. Uma vez que este estudo pretende tratar animais para estudar o comportamento cinético da 6-MMP_r, torna-se importante garantir que o analito em solução chegue íntegro no organismo do animal, assim como que, durante o processo de extração das matrizes, o analito e seus metabólitos se mantenham íntegros e com o mínimo de perdas durante o processo.

O método compreende três etapas (Figura 5). A primeira utiliza DTT na concentração 0,1M, o qual confere proteção aos grupos tiol (SH) e reduz pontes dissulfeto em peptídeos e proteínas. A segunda utiliza metanol como agente precipitante de proteínas. A terceira utiliza clorofórmio que desnatura as proteínas e as torna insolúveis na fase aquosa, onde encontra-se o analito. Ao adicionar uma fase orgânica ao processo de extração, possíveis interferentes de matriz que tenham afinidade com essa fase iram migrar, tornando a fase aquosa mais limpa e facilitando a análise do analito. Ao final do processo, formam-se três fases (Figura 4), onde o precipitado encontra-se no meio, fase aquosa na superfície e a fase orgânica no fundo.

Como demonstrado na figura 5, nesse método de extração, uma alíquota de 50 μ L da matriz é transferida para um tubo do tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, 50 μ L de DTT 0,1M é adicionado na amostra que é levada ao vórtex, em velocidade média, por 30 segundos. Na sequência, 150 μ L de metanol é adicionado na amostra que é levada novamente ao vórtex, em velocidade média, por 30 segundos. Por fim, 50 μ L de clorofórmio é adicionado na amostra que é levada ao vórtex, em velocidade forte, por 30 segundos. Findo o processo, a amostra é centrifugada na condição 12.000 x g (RCF) por 15 minutos a temperatura ambiente e, após, uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante é retirada e adicionada a um vial contendo 200 μ L de metanol.

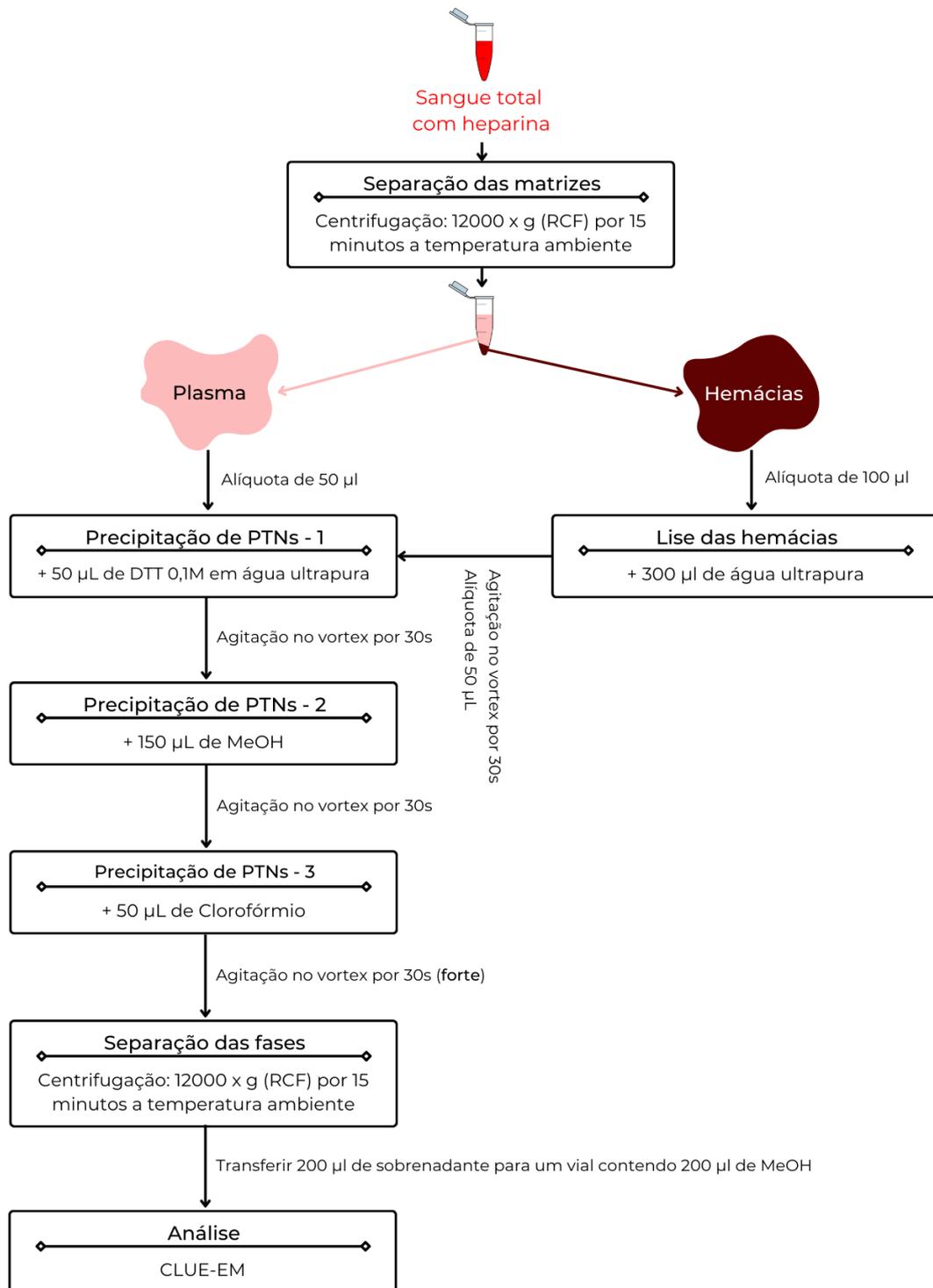
Todas as amostras foram extraídas no dia seguinte à coleta e analisadas não excedendo o período de uma semana pós-extração.

Figura 4 – Amostra extraída



Legenda: Na sequência, da esquerda para a direita, matriz papa de hemácias extraída e matriz plasma extraída.
Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 5 – Método de extração 6-MMPr nas matrizes plasma e papa de hemácias



Fonte: Próprio autor, 2023.

4.10 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Neste estudo, as análises foram realizadas por um sistema de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (CLUE) da Thermo® Dionex Ultimate 3000 associado a um espectrômetro de massas (EM) com analisador do tipo armadilha de íons (*ion trap*) da Thermo® LCQ Fleet, cedido, em colaboração, pela Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais (DPNA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como apresentado na Figura 6.

Figura 6 – CLUE/EM utilizado nesse estudo em colaboração com o DPNA-UFRJ



Fonte: Acervo da Central Analítica do DPNA da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

No método analítico desenvolvido, 3 μL de amostra foi injetado a um sistema cromatográfico composto por uma coluna ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm , column (2.1 mm x 100 mm) da Waters a uma temperatura de 40°C. Duas fases móveis foram utilizadas para conduzir a separação cromatográfica, a fase "A" consistia em água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico, enquanto a fase "B" consistia em acetonitrila. A eluição foi realizada em modo gradiente linear, com taxa de fluxo do eluente fixo em 0,35 mL/min, como apresentado na Tabela 1. Na espectrometria de massas, foi realizada uma ionização por *eletrospray* (IES) no modo positivo. As configurações para temperatura e voltagem do capilar foram, respectivamente, 335°C e 30V, enquanto a voltagem na fonte foi de 5kV. As taxas de fluxo de gás foram: fluxo *sheat gas* 35UA, fluxo *aux gas* 10UA, fluxo *sweep gas* 0UA. Para o desenvolvimento do método analítico, as análises foram realizadas em modo de monitoramento ‘*full scan*’ (modo de monitoramento que analisa todos os íons presentes na amostra) na faixa de m/z 100 a 700 Da. Após a identificação e seleção dos íons de trabalho, as análises foram realizadas em modo ‘*SIM*’ (*Select Ion Monitoring*), a fim de tornar a precisão e a sensibilidade da espectrometria de massas ainda maior, analisando apenas os íons de interesse. No modo ‘*SIM*’ as transições de massas monitoradas foram 152,50 a 153,50 (para a 6-MP), 164,50 a 169,50 (para a 6-MMP), 296,50 a 303,50 (para a 6-MMP_r). Para tratar os dados foi utilizado o programa *Thermo Xcalibur Qual Browser*.

Tabela 1 – Método analítico desenvolvido para análise da 6-MMP_r, 6-MMP e 6-MP

Equipamento	Ionização	Analisador	Coluna	Fase móvel	Temperatura	Fluxo (mL/min)	Gradiente		
							Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
CLUE/EM	<i>eletrospray</i> (IES) modo positivo	<i>Ion trap</i>	ACQUITY C18 1,8 μm (150 mm x 2.1 mm) - Waters	H ₂ O (+ ácido fórmico 0,1%) e ACN	40°C	0,35	0	90	10
						0,35	5	90	10
						0,35	9	75	25
						0,35	10	5	95
						0,35	15	5	95
						0,35	15	90	10
						0,35	20	90	10

Legenda: CLUE/EM – cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas; H₂O – água ultrapura; ACN – acetonitrila; Fase A – água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico; Fase B – acetonitrila. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

4.10.1 Validação do método cromatográfico

Este estudo utilizou a RDC nº 166, de 24/07/2017 da ANVISA, a resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o documento Inmetro DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8 como norteadores para a validação da metodologia analítica.

A validação da 6-MMP_r contemplou os seguintes parâmetros: Especificidade / Seletividade, Linearidade / Sensibilidade, Precisão, Exatidão, Recuperação, Limite de detecção e Limite de quantificação. Devido à contratempos, baixa disponibilidade para utilizar o equipamento e pouco tempo para concluir o estudo, foi escolhido não avaliar o parâmetro opcional robustez, assim como na validação da 6-MMP optou-se por realizar uma validação parcial, contemplando os mesmo parâmetros da validação da 6-MMP_r, porém não sendo feitas análises “intradia” e “interdia” que avalia a congruência entre os resultados de análises de amostras múltiplas, realizadas no mesmo dia e em dias diferentes.

4.10.2 Teste de estabilidade dos padrões

Para testar a estabilidade dos padrões, foram preparadas soluções estoque de cada padrão (6-MMP e 6-MMP_r) na concentração 1 mg/mL em metanol, das quais foram retiradas alíquotas para serem analisadas e, em seguida, foram hermeticamente lacradas e armazenadas a -20°C. Após um período de 60 dias, alíquotas das mesmas soluções foram analisadas para comparação de seus sinais cromatográficos e áreas

4.10.3 Preparo e armazenagem de soluções

A solução estoque de 6-MP foi preparada em balão volumétrico de 25 mL usando NH₄OH 1N em uma concentração final de 1 mg/mL. De maneira semelhante, as soluções de 6-MMP e 6-MMP_r foram preparadas em balão volumétrico de 25 mL usando metanol em uma concentração final de 1 mg/mL.

O ditionitrito (DTT), utilizado no método de extração, foi preparado em balão volumétrico de 25 mL usando água ultrapura em uma concentração final de 0,1 M.

As soluções dos padrões foram armazenadas a -20°C e utilizadas por no máximo 30 dias, enquanto a solução do DTT foi armazenada entre 2 - 8 °C, sendo estabelecido o tempo de armazenamento e uso de no máximo uma semana, devido à instabilidade do DTT em solução.

5 RESULTADOS

5.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMPR, 6-MMP e 6-MP POR CLUE/EM

Para testar o método analítico foi preparada uma solução estoque do padrão 6-MP na concentração 1 mg/mL em NH_4OH 1N e dos padrões 6-MMP e 6-MMPr na concentração 1 mg/mL em metanol. Uma alíquota dessas soluções foi retirada e diluída com metanol na proporção 1:1, gerando uma concentração final de 0,5 mg/mL. Os padrões foram injetados juntos e separadamente nas condições descritas na Tabela 1.

O método gerou um sinal cromatográfico intenso e simétrico da 6-MP após 1 minutos de corrida (Figura 7 e Tabela 2). A fragmentação da 6-MP em modo de análise positivo gerou majoritariamente os íons moleculares protonados 153 (correspondente ao íon $152 + 1$ próton) e 326 (correspondente ao íon $325 + 1$ próton).

O método gerou um sinal cromatográfico intenso e simétrico da 6-MMP após 5 minutos de corrida (Figura 8 e Tabela 2). A fragmentação da 6-MMP em modo de análise positivo gerou majoritariamente o íon molecular protonado 167 (correspondente ao íon $166 + 1$ próton).

O método gerou um sinal cromatográfico intenso e simétrico da 6-MMPr após 7 minutos de corrida (Figura 9 e Tabela 2). A fragmentação da 6-MMPr em modo de análise positivo gerou majoritariamente os íons moleculares protonados 167 (correspondente ao íon $166 + 1$ próton) e 299 (correspondente ao íon $298 + 1$ próton).

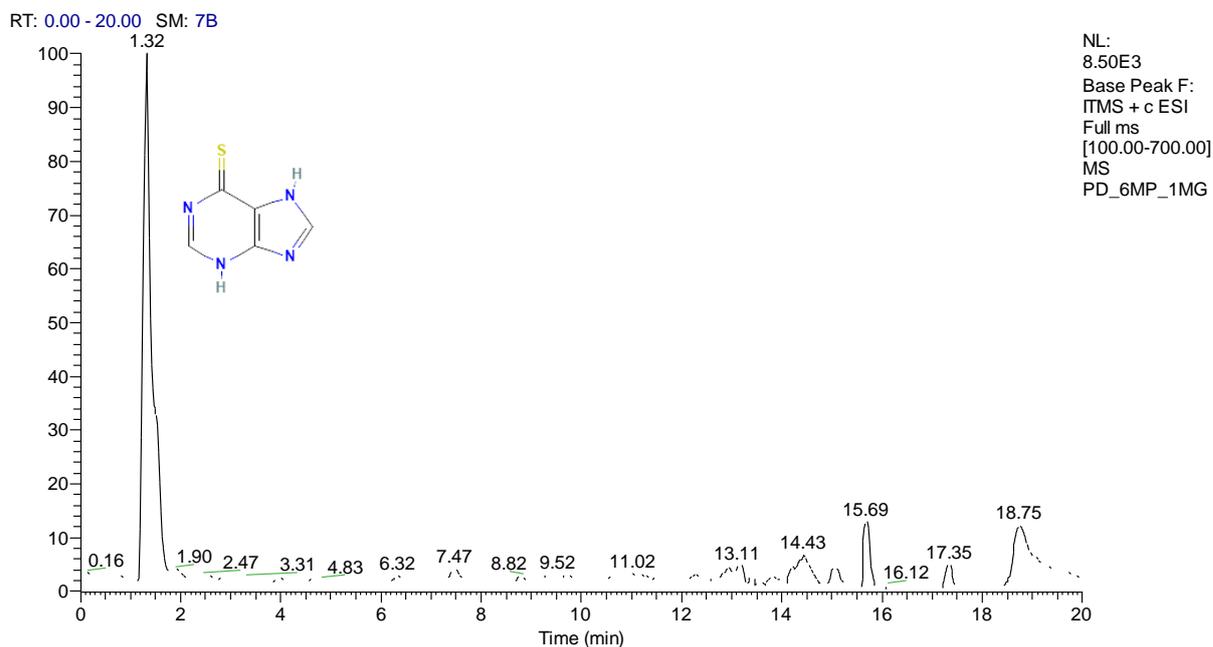
Os valores de massas foram conferidas na *National Center for Biotechnology Information – Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 2 – Dados obtidos pela análise por CLUE-IES-EM em modo de monitoramento ‘full scan’

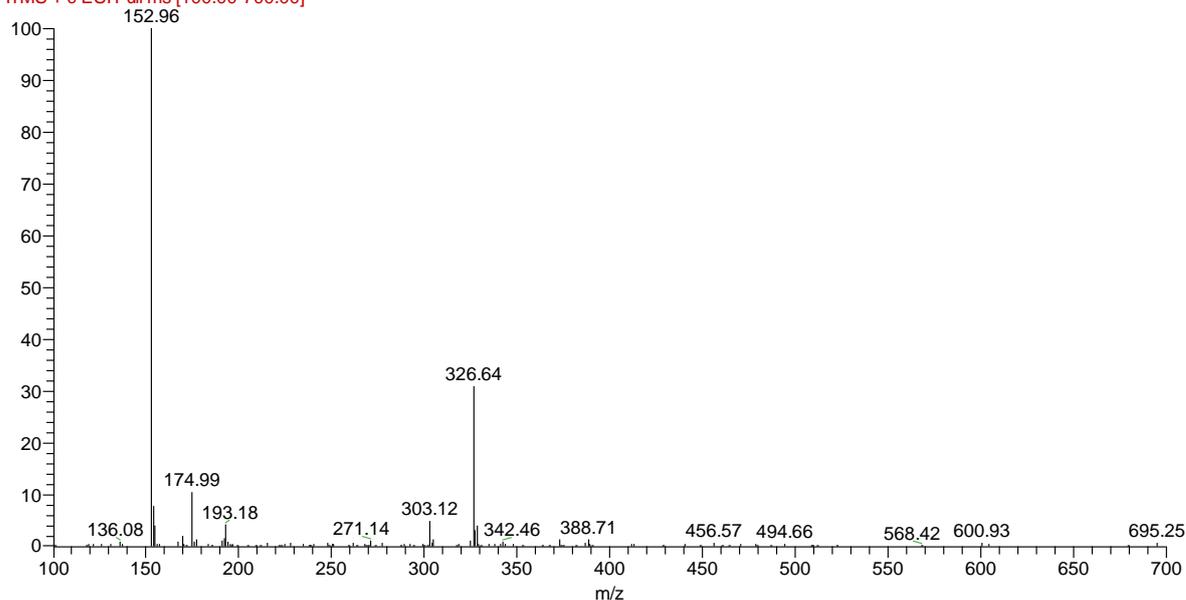
Padrão	Fórmula molecular	Tempo de retenção	Ion molecular	Massa calculada
6-MP	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{S}$	$1,3 \pm 0,2$	152	153
6-MMP	$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$	$5,0 \pm 0,2$	166	167
6-MMPr	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	$7,9 \pm 0,2$	298	299

Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 7 – Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MP por CLUE/EM

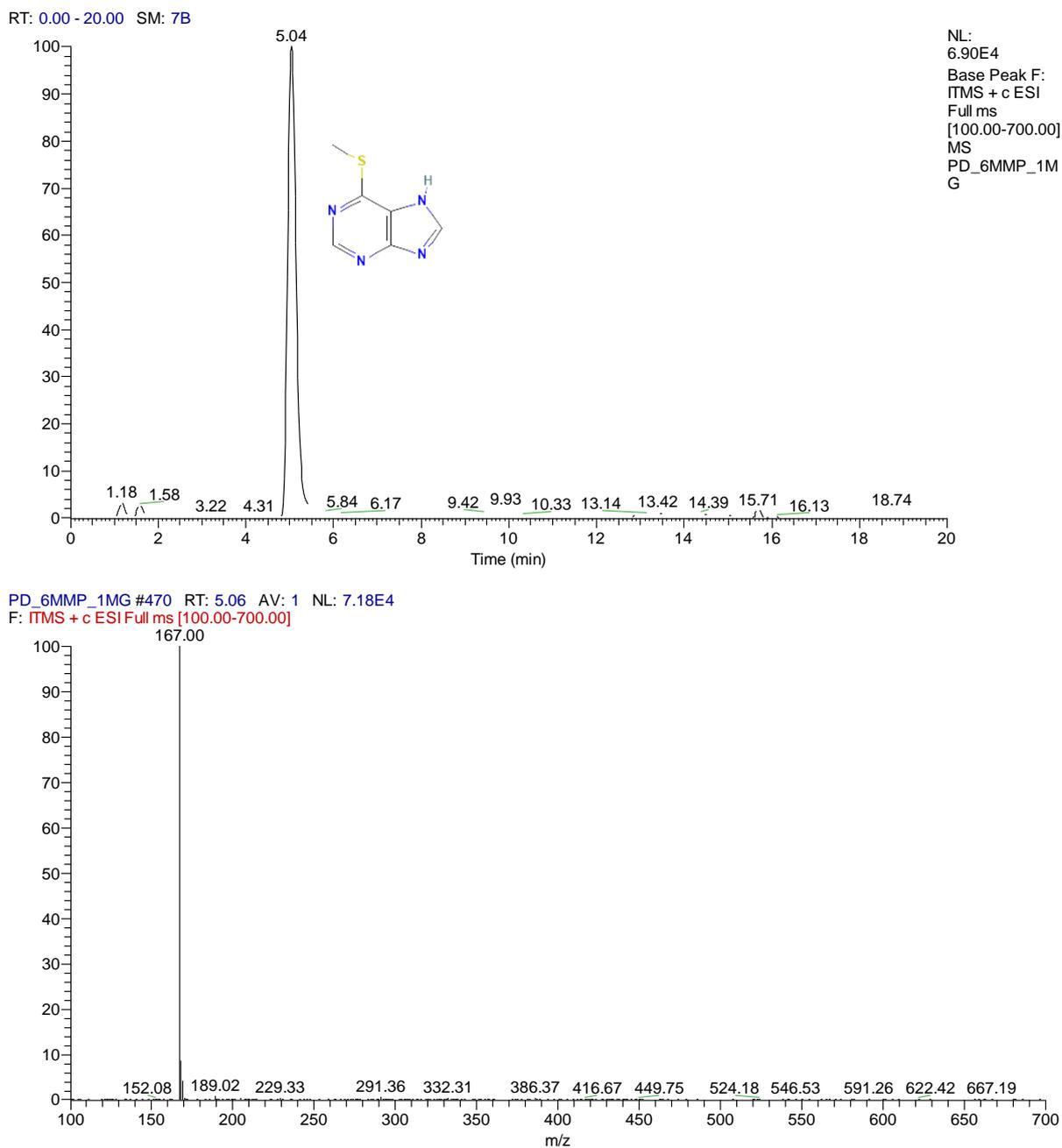


PD_6MP_1MG #122 RT: 1.32 AV: 1 NL: 1.10E4
 F: ITMS + c ESI Full ms [100.00-700.00]



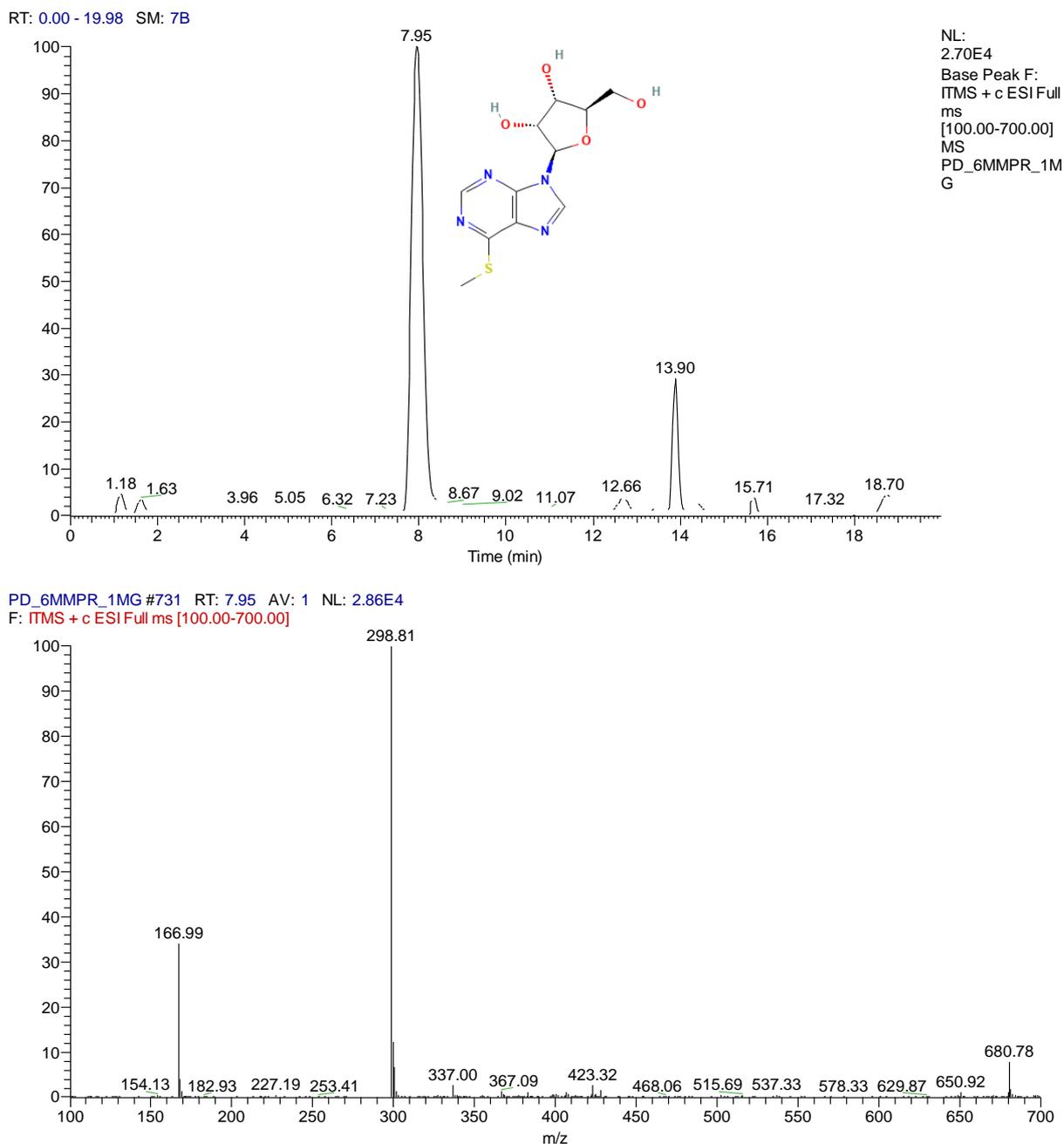
Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “full scan”. Tempo de retenção da 6-MP = $1,3 \pm 0,2$. Amostra = padrão 6-MP na concentração 0,5 mg/mL em $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeOH}$ (1:1). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 8 – Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MMP por CLUE/EM



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “full scan”. Tempo de retenção da 6-MMP = $5,0 \pm 0,2$. Amostra = padrão 6-MMP na concentração 0,5mg/mL em MeOH. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 9 – Cromatograma e espectro de massas obtidos na análise do padrão 6-MMPr por CLUE/EM



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “full scan”. Tempo de retenção da 6-MMPr = $7,9 \pm 0,2$. Amostra = padrão 6-MMPr na concentração 0,5 mg/mL em MeOH. **Nota:** O sinal cromatográfico no tempo de retenção 13,9 é referente a alguma impureza presente no padrão da 6-MMPr. Nas análises realizadas em modo “SIM” o sinal da impureza não aparece. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMPR

5.2.1 Especificidade / Seletividade

O método analítico demonstrou especificidade e seletividade para a 6-MMPr, sendo capaz de identificar e quantificar o nucleosídeo, inequivocamente, mesmo na presença de interferentes de matriz e de outros padrões.

A mesma concentração do padrão 6-MMPr foi analisada isoladamente nas matrizes branco (metanol), plasma e papa de hemácias, e junto ao padrão 6-MMP na matriz branco (metanol), o que permitiu comparar os sinais cromatográficos e áreas e demonstrar a especificidade e seletividade do método, como está apresentado na tabela 3 e na figura 10.

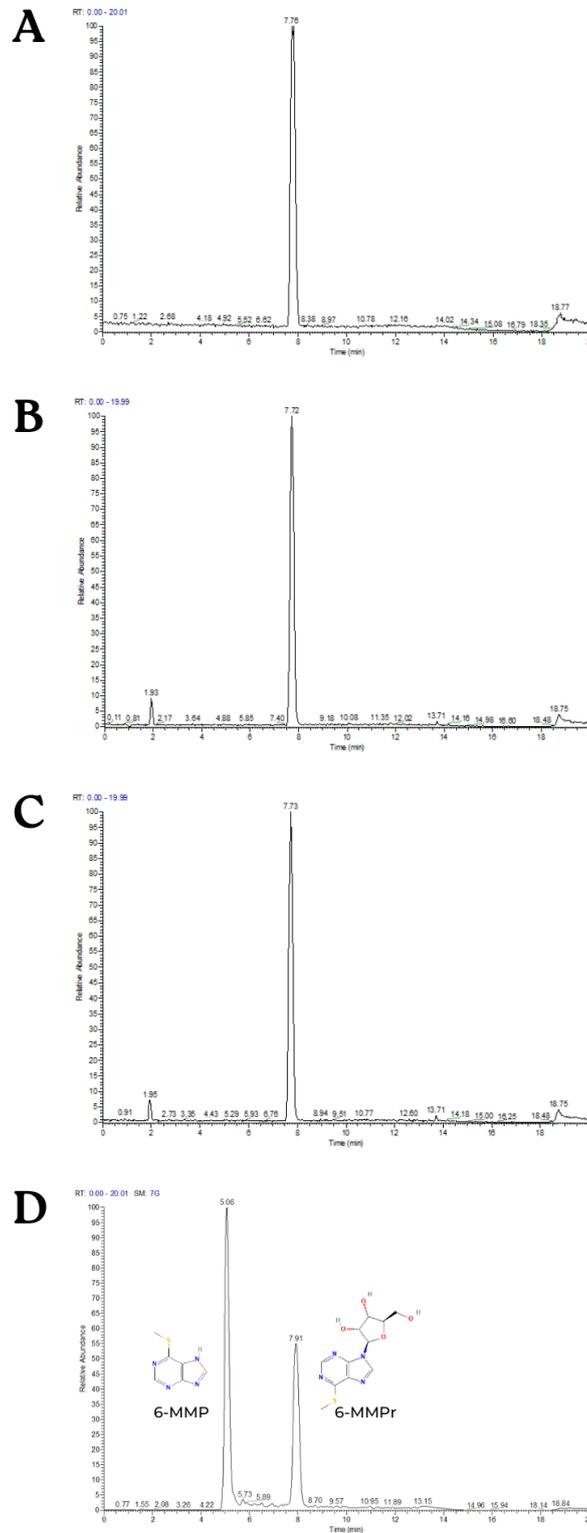
Foi observado grande semelhança nos resultados das três matrizes, sugerindo que a recuperação do analito foi bem-sucedida, assim como não deve haver efeito de matriz significativo.

Tabela 3 – Tempo de retenção e área da 6-MMPr nas matrizes metanol, plasma e papa de hemácias

Matriz	Máximo TR	Início TR	Fim TR	Área
Metanol	7.76	7.56	8.06	128758.4
Plasma	7.72	7.51	8.00	121751.8
Papa de hemácias	7.73	7.53	8.00	120449.0

Legenda: TR – tempo de retenção. Máximo TR – tempo referente ao pico máximo do sinal cromatográfico. Início TR – tempo referente ao início do sinal cromatográfico. Fim TR – tempo referente ao final do sinal cromatográfico. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 10 – Cromatogramas demonstrando especificidade e seletividade da 6-MMPr

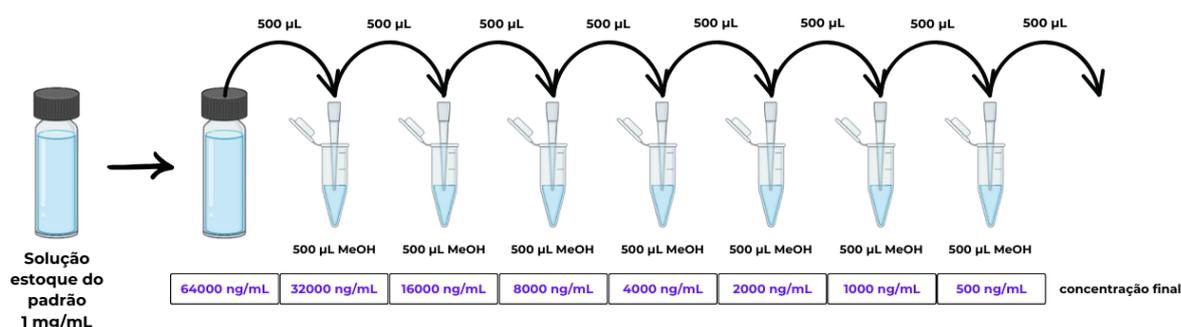


Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento "SIM". Tempo de retenção da 6-MMPr = $7,9 \pm 0,2$. No eixo Y encontra-se a abundância relativa. No eixo X encontra-se o tempo de análise. A – matriz metanol dopada com o padrão 6-MMPr; B – matriz plasma dopada com o padrão 6-MMPr; C – matriz papa de hemácias dopada com o padrão 6-MMPr; D – matriz metanol dopada com os padrões 6-MMP e 6-MMPr. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.2.2 Linearidade / Sensibilidade

A linearidade / sensibilidade do método foi avaliada por meio da análise da curva analítica da 6-MMPr nas matrizes branco (metanol), plasma e papa de hemácias no intervalo de concentração entre 500 e 64000 ng/mL, formando três curvas analíticas com oito níveis de concentração neste intervalo: 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000, 32000, 64000 ng/mL. A curva analítica foi preparada através de diluições seriadas do padrão (Figura 11), as quais foram utilizadas para dopar as matrizes posteriormente.

Figura 11 – Diluições seriadas da curva analítica



Fonte: Próprio autor, 2023.

O critério de aceitação para o coeficiente de correlação linear (R^2) na projeção da curva analítica foi igual ou superior a 0,99, como preconizado pela RDC nº 166, de 24/07/2017 da ANVISA. As equações lineares foram obtidas por cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Todas as curvas demonstraram linearidade apresentando coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 (Figuras 12, 13, 14).

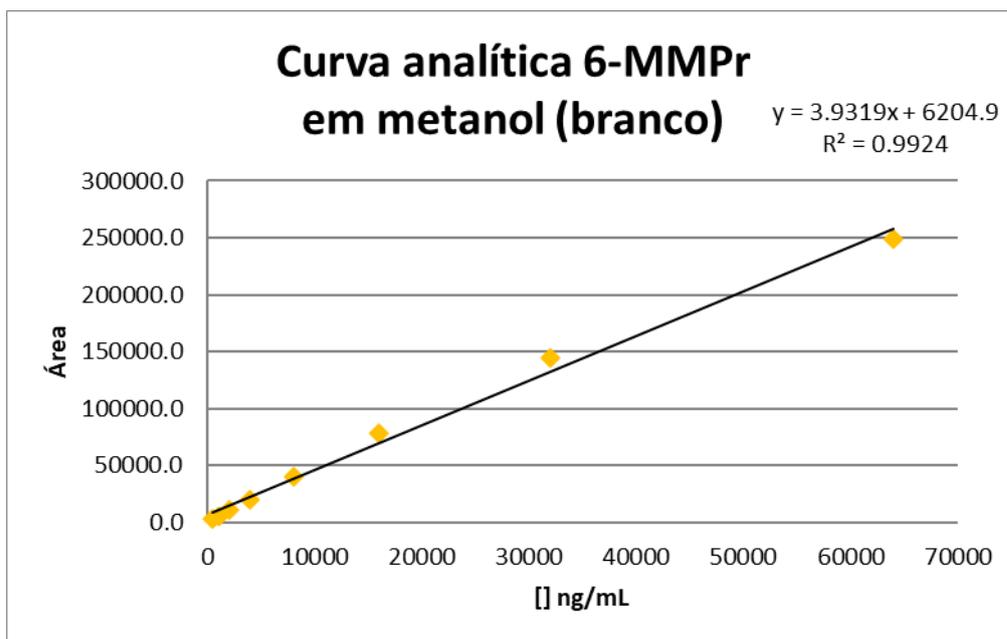
Como orientado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8, o efeito de matriz foi avaliado através do teste *t* (*Student*) para comparação das inclinações das curvas analíticas. Para que fosse aplicado o teste *t*, foi realizado previamente o teste *f* (*Fisher*) e verificado se as amostras possuíam variâncias supostamente iguais ou diferentes. Como apresentado na Tabela 4, os valores de *p* foram maiores que 0,05 e, portanto, devemos aceitar a hipótese nula de que não há diferença significativa entre as variâncias das médias, assim como não há diferença significativa entre as médias. Sendo assim, não há efeito de matriz significativo, permitindo que as próximas etapas da validação fossem demonstradas apenas na matriz branco (metanol).

Tabela 4 – Valores de p / Efeito de matriz da 6-MMPr

Matrizes	p-valor (teste f)	p-valor (teste t)
Branco x Plasma	0,88	0,45
Branco x Papa de hemácias	0,87	0,48

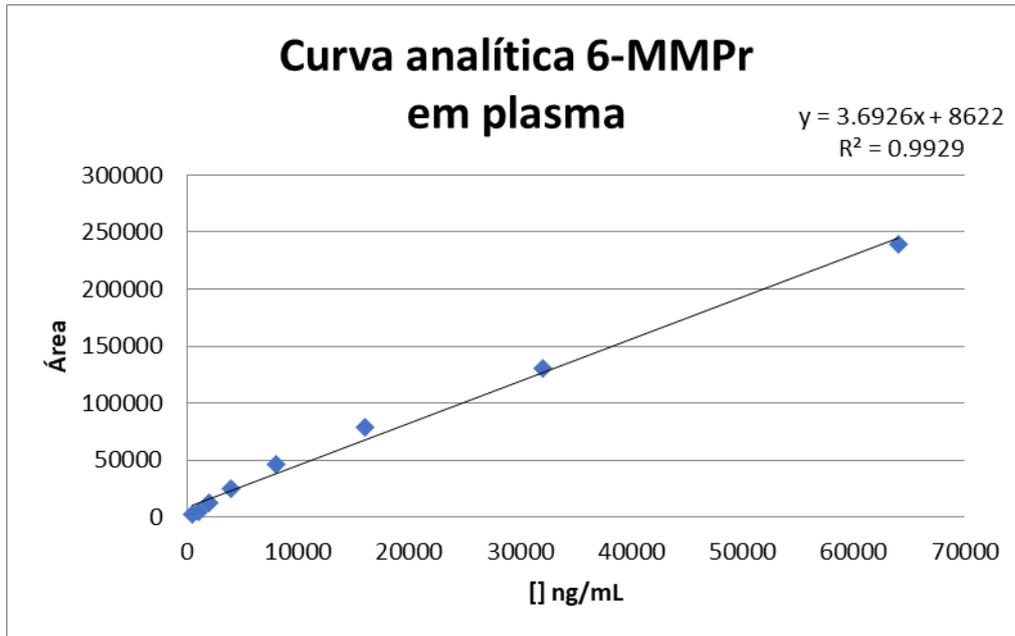
Legenda: teste f (teste f de fisher) – avalia a variância entre duas médias. teste t (teste t de student) – compara duas médias quanto a uma variável quantitativa com distribuição normal. p-valor – medida da força de evidência dos achados contra H_0 . $p < 0,05$. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 12 – Curva analítica da 6-MMPr em metanol



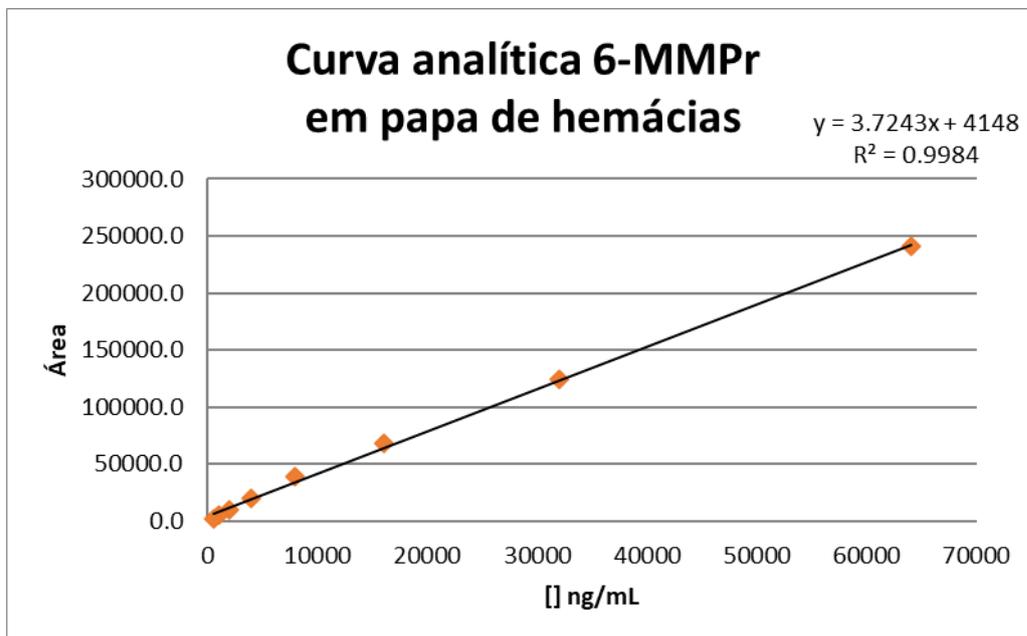
Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 13 – Curva analítica da 6-MMPr em plasma



Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 14 – Curva analítica da 6-MMPr em papa de hemácias



Fonte: Próprio autor, 2023.

5.2.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada “intradia” (avalia congruência entre os resultados de análises de amostras múltiplas, realizadas no mesmo dia) e “interdia” (avalia congruência entre os resultados de análises de amostras múltiplas, realizadas em dias diferentes), considerando três níveis de concentração da curva analítica: 64000, 32000 e 16000 ng/mL, em triplicata.

O critério de aceitação estabelecido para os coeficientes de variação (CV) foi de valores iguais ou inferiores a 15%, conforme descrito na resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

Como representado na Tabela 5, o método demonstrou ser preciso, expressando valores de CV inferiores a 15%.

Tabela 5 – Precisão do método analítico para a 6-MMP_r

ng/mL	Precisão (CV%)		
	64000 (n=12)	32000 (n=12)	16000 (n=12)
Intradia	2,28	1,50	0,93
Interdia	0,45	0,20	0,37

Nota: Fórmula - $CV\% = (DP/CMD) \times 100$, onde DP é o desvio-padrão e CMD é a concentração média determinada. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.2.4 Exatidão e Recuperação

A exatidão e a recuperação do método foram avaliadas “intradia” e “interdia”, considerando três níveis de concentração da curva analítica: 64000, 32000 e 16000 ng/mL, em triplicata.

A exatidão foi expressa por meio da recuperação percentual do analito de concentração conhecida adicionado à amostra. O critério de aceitação estabelecido para a recuperação foi de valores entre 80% e 115%, conforme descrito no documento Inmetro DOQ-CGCRE-008.

Como representado na Tabela 6, o método analítico demonstrou ser exato e recuperar satisfatoriamente a 6-MMP_r.

Tabela 6 – Exatidão / Recuperação do método analítico para a 6-MMPr

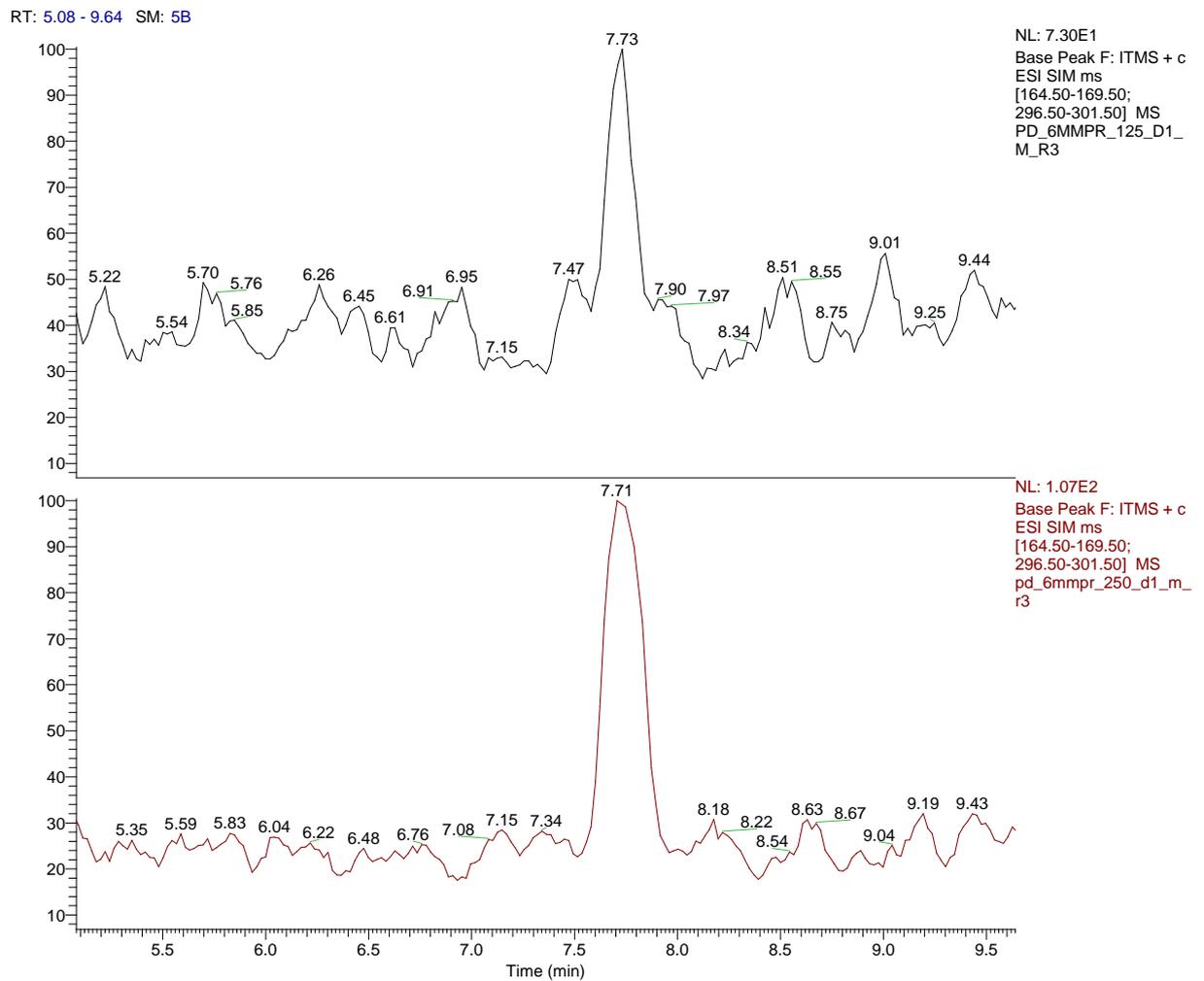
ng/mL	Exatidão / Recuperação (%)		
	64000 (n=12)	32000 (n=12)	16000 (n=12)
Intradia	95,06	109,62	110,82
Interdia	95,06	109,62	110,81

Nota: Fórmula - Exatidão / Recuperação = (CMD/CT)x100, onde CMD é concentração média determinada e CT é a concentração teórica. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.2.5 Limites de detecção e quantificação

Por meio de uma curva concentração-resposta do padrão 6-MMPr em metanol, o limite de detecção (LD) encontrado para a 6-MMPr foi de 125 ng/mL e o limite de quantificação (LQ) foi de 250 ng/mL, como apresentado na Figura 15. Os valores encontrados também se aplicam às matrizes plasma e papa de hemácias, haja vista que não foi encontrado efeito de matriz significativo ao comparar essas matrizes com a matriz branco (metanol).

Figura 15 – Cromatogramas referentes ao limite de detecção e quantificação da 6-MMP_r, respectivamente



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. O cromatograma superior (em preto) é referente a amostra padrão de 6-MMP_r em metanol na concentração 125 ng/mL = LOD, enquanto o cromatograma inferior (em vermelho) é referente a amostra padrão de 6-MMP_r em metanol na concentração 250 ng/mL = LOQ. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A 6-MMP

5.3.1 Especificidade / Seletividade

O método analítico demonstrou especificidade e seletividade para a 6-MMP, sendo capaz de identificar e quantificar o nucleosídeo, inequivocamente, mesmo na presença de interferentes de matriz e de outros padrões.

A mesma concentração do padrão 6-MMP foi analisada isoladamente nas matrizes branco (metanol), plasma e papa de hemácias, e junto ao padrão 6-MMP na matriz branco (metanol), o que permitiu comparar os sinais cromatográficos e áreas e demonstrar a especificidade e seletividade do método, como está apresentado na Tabela 7 e na Figura 16.

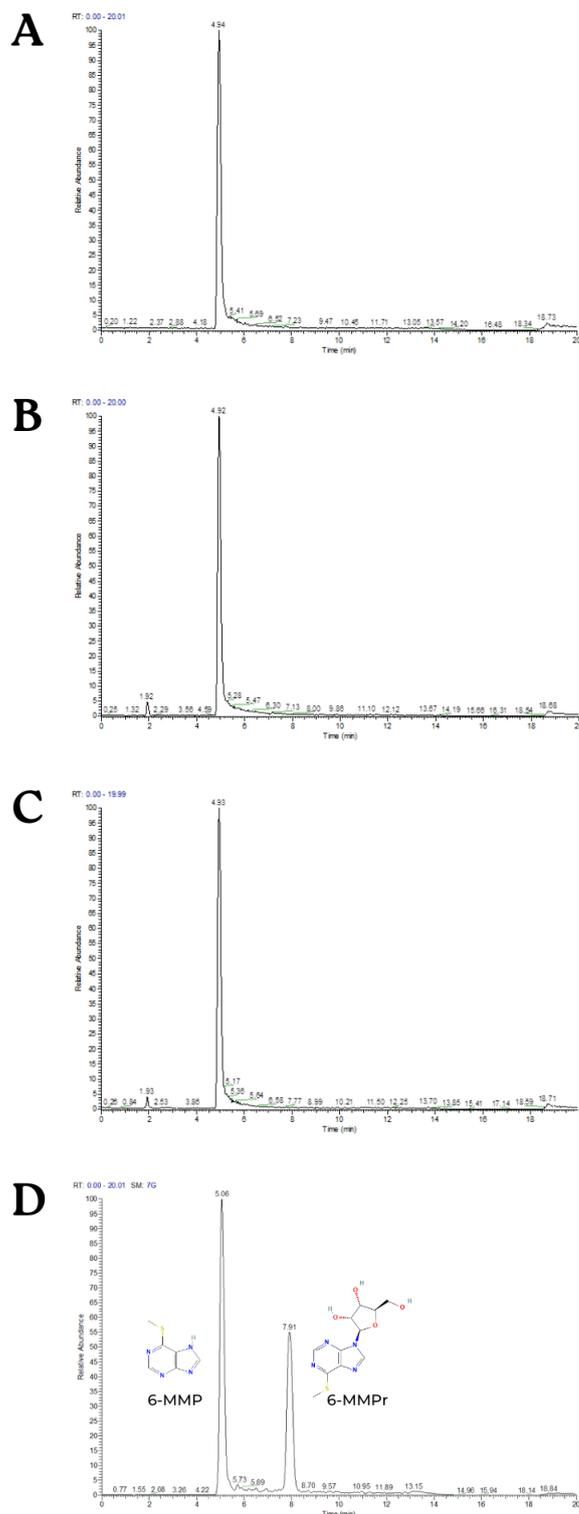
Foi observado grande semelhança nos resultados das três matrizes, sugerindo que a recuperação do analito foi bem-sucedida, assim como não deve haver efeito de matriz significativo.

Tabela 7 – Tempo de retenção e área da 6-MMP nas matrizes metanol, plasma e papa de hemácias

Matriz	Máximo TR	Início TR	Fim TR	Área
Metanol	4.94	4.77	6.20	246846
Plasma	4.92	4.76	6.58	243407
Papa de hemácias	4.93	7.79	6.15	245331

Legenda: TR – tempo de retenção. Máximo TR – tempo referente ao pico máximo do sinal cromatográfico. Início TR – tempo referente ao início do sinal cromatográfico. Fim TR – tempo referente ao final do sinal cromatográfico. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 16 – Cromatogramas demonstrando especificidade e seletividade da 6-MMP



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP = $4,9 \pm 0,2$. No eixo Y encontra-se a abundância relativa. No eixo X encontra-se o tempo de análise. A – matriz metanol dopada com o padrão 6-MMP; B – matriz plasma dopada com o padrão 6-MMP; C – matriz papa de hemácias dopada com o padrão 6-MMP; D – matriz metanol dopada com os padrões 6-MMP e 6-MMPr. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.3.2 Linearidade / Sensibilidade

A linearidade / sensibilidade do método foi avaliada por meio da análise da curva analítica da 6-MMP nas matrizes branco (metanol), plasma e papa de hemácias no intervalo de concentração entre 1000 e 64000 ng/mL, formando três curvas analíticas com quatro níveis de concentração neste intervalo: 1000, 4000, 16000, 64000 ng/mL. A curva analítica foi realizada através de diluições seriadas de forma semelhante ao realizado na validação da 6-MMP.

O critério de aceitação para o coeficiente de correlação linear (R^2) na projeção da curva analítica foi igual ou superior a 0,99, como preconizado pela RDC nº 166, de 24/07/2017 da ANVISA. As equações lineares foram obtidas por cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Todas as curvas demonstraram linearidade apresentando coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 (Figuras 17, 18, 19).

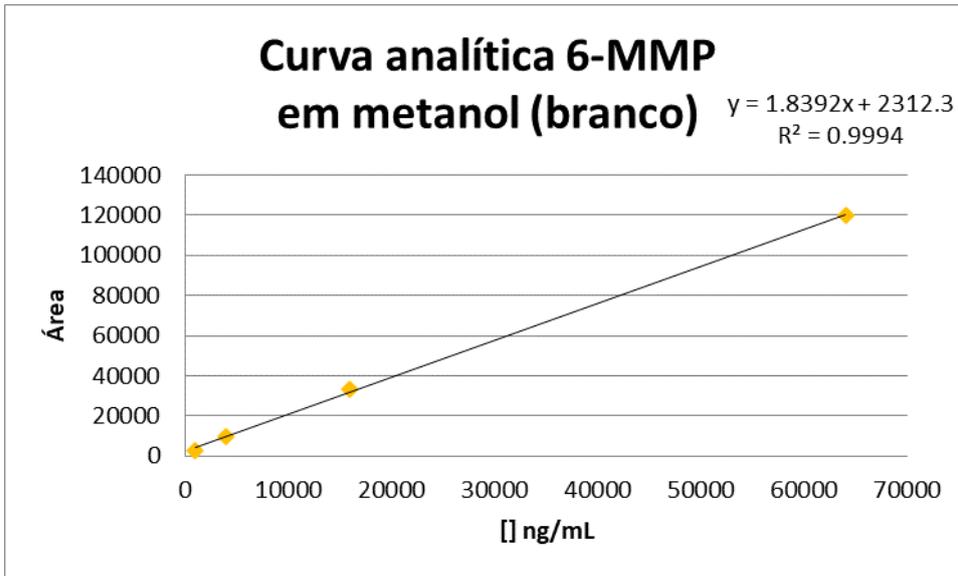
Como orientado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8, o efeito de matriz foi avaliado através do teste t (*Student*) para comparação das inclinações das curvas analíticas. Para que fosse aplicado o teste t , foi realizado previamente o teste f (*Fisher*) e verificado se as amostras possuíam variâncias supostamente iguais ou diferentes. Como apresentado na Tabela 8, os valores de p foram maiores que 0,05 e, portanto, devemos aceitar a hipótese nula de que não há diferença significativa entre as variâncias das médias, assim como não há diferença significativa entre as médias. Sendo assim, não há efeito de matriz significativo, permitindo que as outras etapas da validação fossem demonstradas apenas na matriz branco (metanol).

Tabela 8 – Valores de p / Efeito de matriz da 6-MMP

Matrizes	p-valor (teste f)	p-valor (teste t)
Branco x Plasma	0,84	0,44
Branco x Papa de hemácias	0,93	0,48

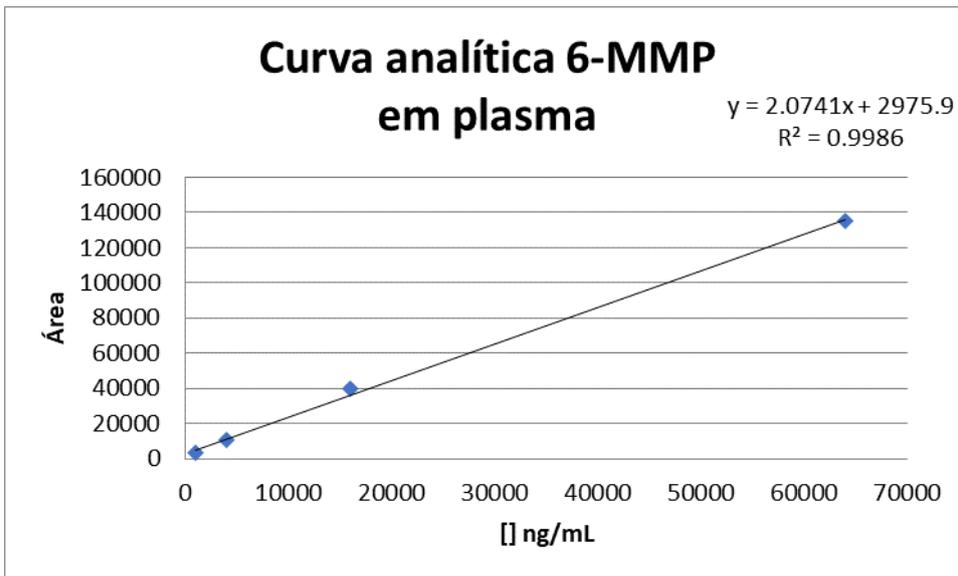
Legenda: teste f (teste f de fisher) – avalia a variância entre duas médias. teste t (teste t de student) – compara duas médias quanto a uma variável quantitativa com distribuição normal. p-valor – medida da força de evidência dos achados contra H_0 . $p < 0,05$. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 17 – Curva analítica da 6-MMP em metanol



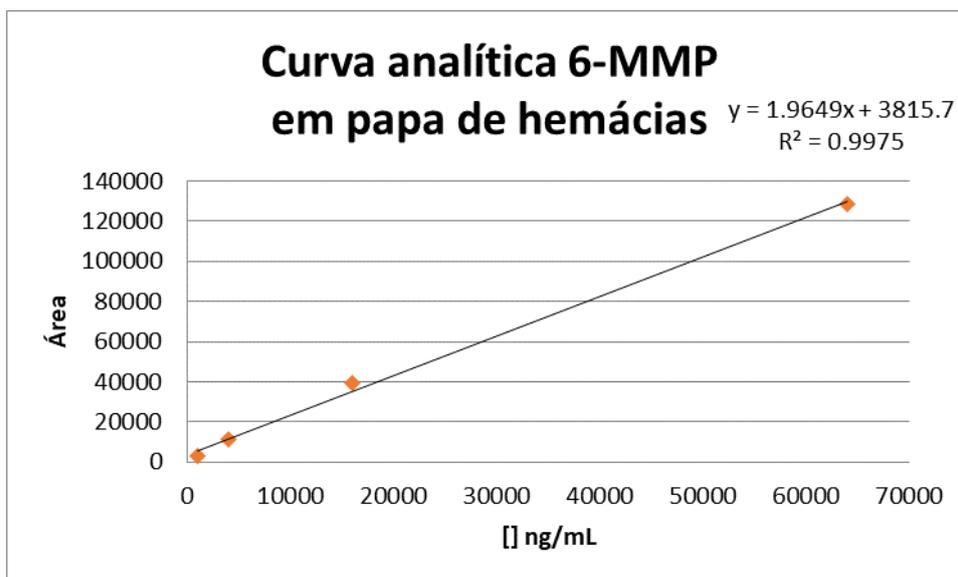
Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 18 – Curva analítica da 6-MMP em plasma



Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 19 – Curva analítica da 6-MMP em papa de hemácias



Fonte: Próprio autor, 2023.

5.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em análise única, considerando três níveis de concentração da curva analítica: 64000, 16000 e 4000 ng/mL, em triplicata.

O critério de aceitação estabelecido para os coeficientes de variação (CV) foi de valores iguais ou inferiores a 15%, conforme descrito na resolução n° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

Como representado na Tabela 9, o método demonstrou ser preciso, expressando valores de CV inferiores a 15%.

Tabela 9 – Precisão do método analítico para a 6-MMP

ng/mL	64000 (n=3)	16000 (n=3)	4000 (n=3)
Precisão (CV%)	1,76	1,50	3,05

Nota: Fórmula - $CV\% = (DP/CMD) \times 100$, onde DP é o desvio-padrão e CMD é a concentração média determinada. Fonte: Próprio autor, 2023.

5.3.4 Exatidão e Recuperação

A exatidão e a recuperação do método foram avaliadas em análise única, considerando três níveis de concentração da curva analítica: 64000, 16000 e 4000 ng/mL, em triplicata.

A exatidão foi expressa por meio da recuperação percentual do analito de concentração conhecida adicionado à amostra. O critério de aceitação estabelecido para a recuperação foi de valores entre 80% e 115%, conforme descrito no documento Inmetro DOQ-CGCRE-008.

Como representado na Tabela 10, o método analítico demonstrou ser exato e recuperar satisfatoriamente a 6-MMP.

Tabela 10 – Exatidão / Recuperação do método analítico para a 6-MMP

ng/mL	64000 (n=3)	16000 (n=3)	4000 (n=3)
Exatidão / Recuperação (%)	99,60	105,80	97,90

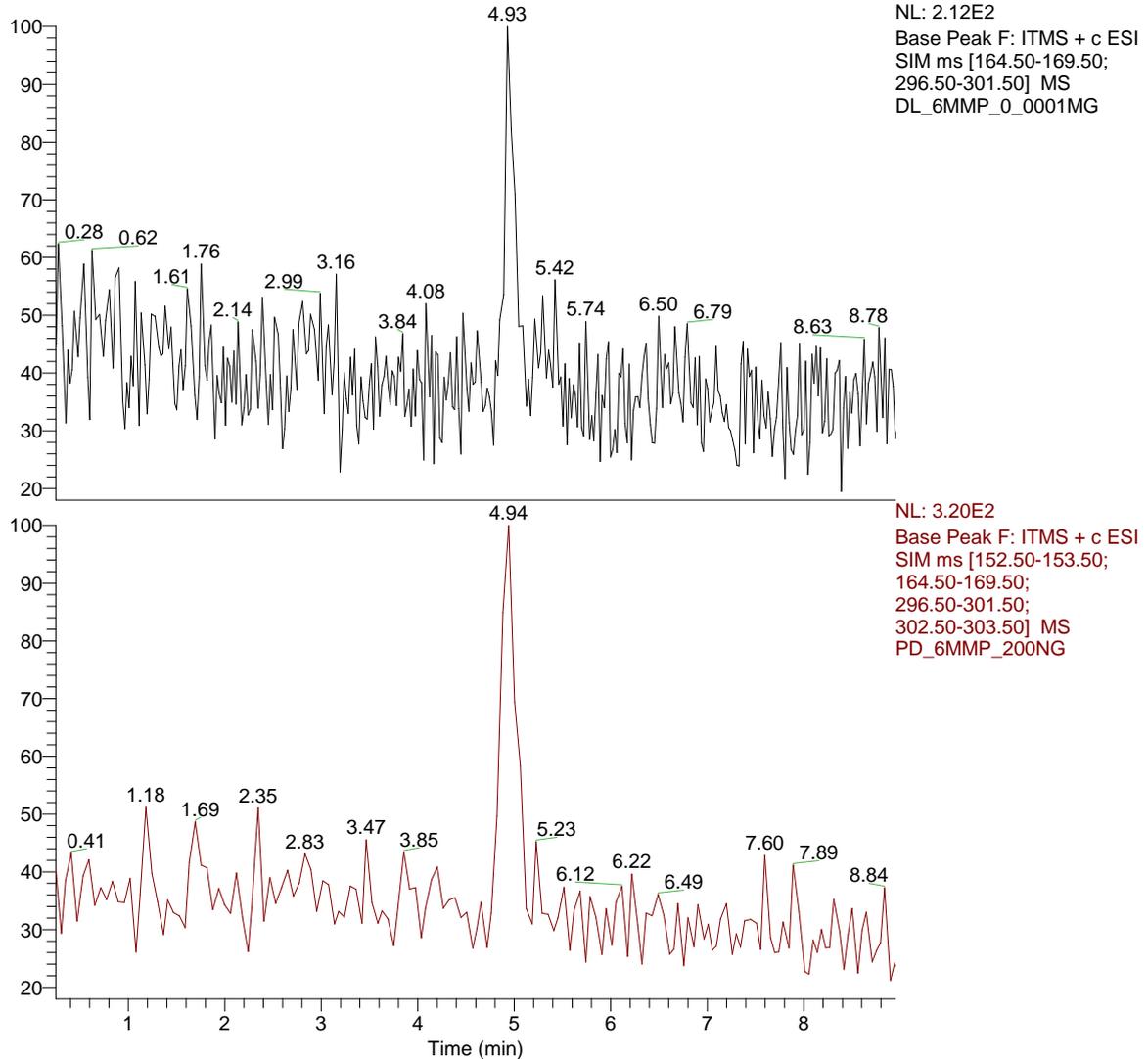
Nota: Fórmula - Exatidão / Recuperação = $(CMD/CT) \times 100$, onde CMD é concentração média determinada e CT é a concentração teórica. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.3.5 Limites de detecção e quantificação

Por meio de uma curva concentração-resposta do padrão 6-MMP em metanol, o limite de detecção (LD) encontrado para a 6-MMP foi de 100 ng/mL e o limite de quantificação (LQ) foi de 200 ng/mL, como apresentado na Figura 20. Os valores encontrados também se aplicam às matrizes plasma e papa de hemácias, haja vista que não foi encontrado efeito de matriz significativo ao comparar essas matrizes com a matriz branco (metanol).

Figura 20 – Cromatogramas referentes ao limite de detecção e quantificação da 6-MMP

RT: 0.25 - 8.95



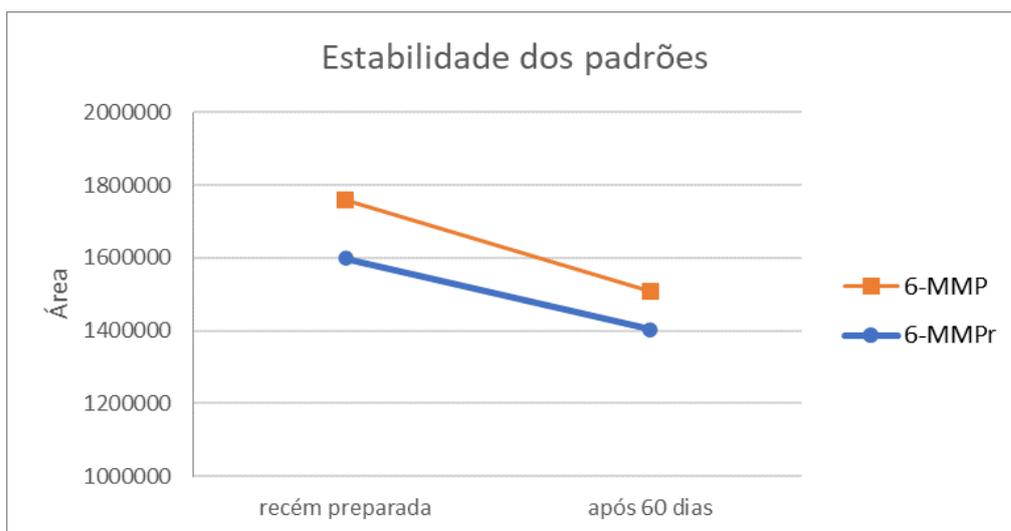
Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP = $4,9 \pm 0,2$. O cromatograma superior (em preto) é referente a amostra padrão de 6-MMP em metanol na concentração 100 ng/mL = LOD, enquanto o cromatograma inferior (em vermelho) é referente a amostra padrão de 6-MMP em metanol na concentração 200 ng/mL = LOQ. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.4 ESTABILIDADE DOS PADRÕES 6-MMP E 6-MMPR

Ao comparar os resultados das análises dos padrões em solução estoque (metanol) recém preparada com os resultados das mesmas soluções reanalisadas após 60 dias, foi possível perceber alteração nos cromatogramas e áreas, como apresentado nas Figuras 21, 22 e 23. Enquanto os cromatogramas após 60 dias apresentaram possíveis sinais de degradação do padrão, as áreas demonstraram queda, representando alteração na concentração do padrão.

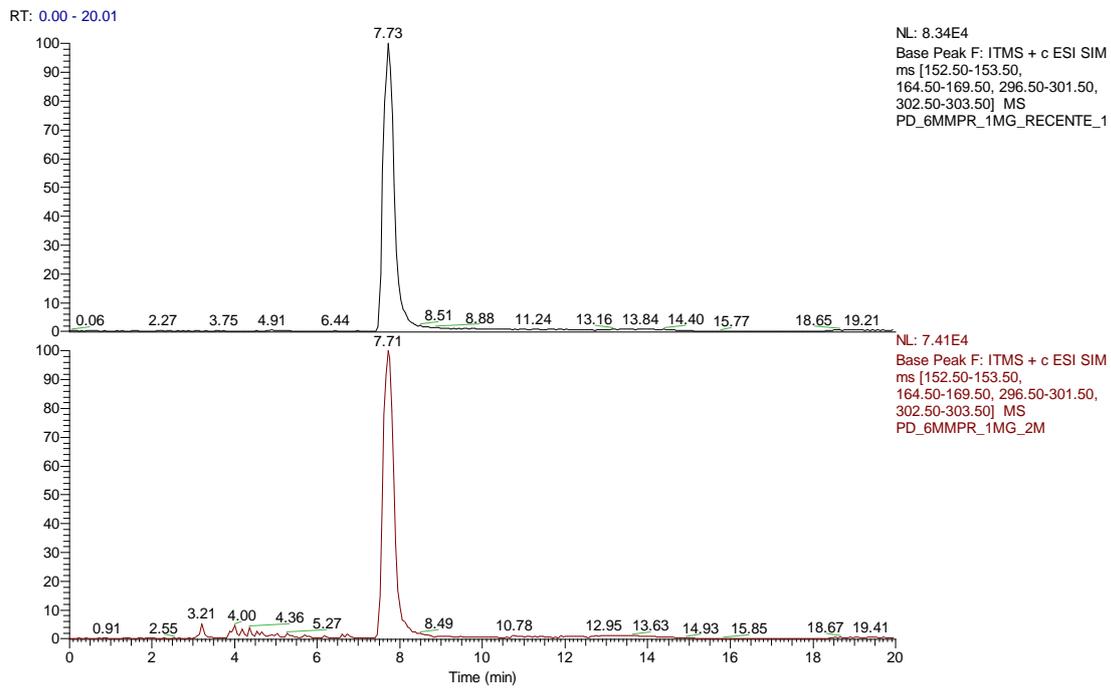
Através do resultado do teste de estabilidade, que mostrou perda aproximada de 10% na concentração dos padrões após 60 dias, foi determinado que as soluções estoque dos padrões fossem armazenadas a -20°C e utilizadas por no máximo 30 dias, bem como as amostras dos animais tratados também fossem armazenadas nessas condições e analisadas dentro do período de 30 dias após a coleta.

Figura 21 – Estabilidade dos padrões 6-MMP e 6-MMPr em solução (metanol)



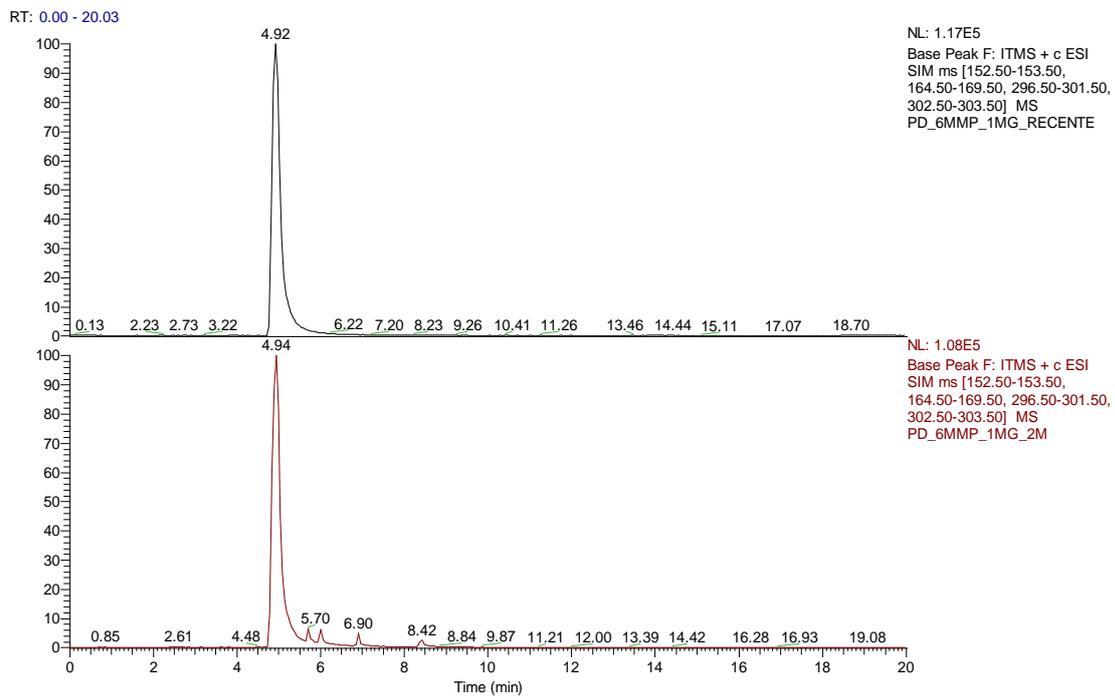
Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 22 – Cromatogramas referentes aos resultados de estabilidade do padrão 6-MMP_r em solução (metanol)



Nota: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. O cromatograma superior (em preto) é referente a amostra recém preparada, enquanto o cromatograma inferior (em vermelho) é referente a amostra analisada após 60 dias. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 23 – Cromatogramas referentes aos resultados de estabilidade do padrão 6-MMP em solução (metanol)



Nota: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP = $4,9 \pm 0,2$. O cromatograma superior (em preto) é referente a amostra recém preparada, enquanto o cromatograma inferior (em vermelho) é referente a amostra analisada após 60 dias. **Fonte:** Próprio autor, 2023.

5.5 CINÉTICA DA 6-MMPR: CURVA DAS ALTERAÇÕES DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS (PLASMÁTICOS E ERITROCITÁRIOS) AO LONGO DO TEMPO EM RATAS GRÁVIDAS E NÃO GRÁVIDAS

Para garantir a veracidade dos resultados, uma alíquota de 50 μL da mesma solução de salina contendo 3 mg/mL de 6-MMPPr que foi utilizada nos tratamentos foi adicionada no sangue total branco (sangue de animal não tratado), como demonstrado na Figura 24. A amostra dopada foi, então, incubada por um período de duas horas (120 minutos) em uma temperatura de 37°C (média de temperatura corporal do rato), no intuito de simular *in vitro* as condições em que o nucleosídeo é submetido no compartimento sanguíneo *in vivo* e, assim, avaliar se o analito permanece íntegro. Findo a incubação do sangue total dopado com 6-MMPPr, foi feita a separação das matrizes que, em seguida, passaram pelo processo de extração e, por fim, foram analisadas.

Os resultados mostraram que a 6-MMPPr se manteve íntegra durante o período de incubação, por meio da observação do sinal cromatográfico intenso do nucleosídeo, bem como da ausência de sinais de possíveis produtos de degradação. Os cromatogramas das amostras incubadas foram comparados com os cromatogramas das amostras controle (salina + 6-MMPPr e metanol + 6-MMPPr), como mostra a Figura 25. Para controle, também foram analisadas amostras branco (ausência de padrão) das matrizes, metanol, plasma e papa de hemácias, como mostra a Figura 26.

Figura 24 – Processo incubação da 6-MMPPr *in vitro*

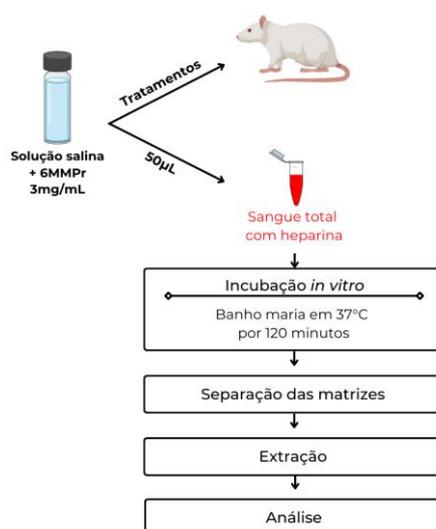
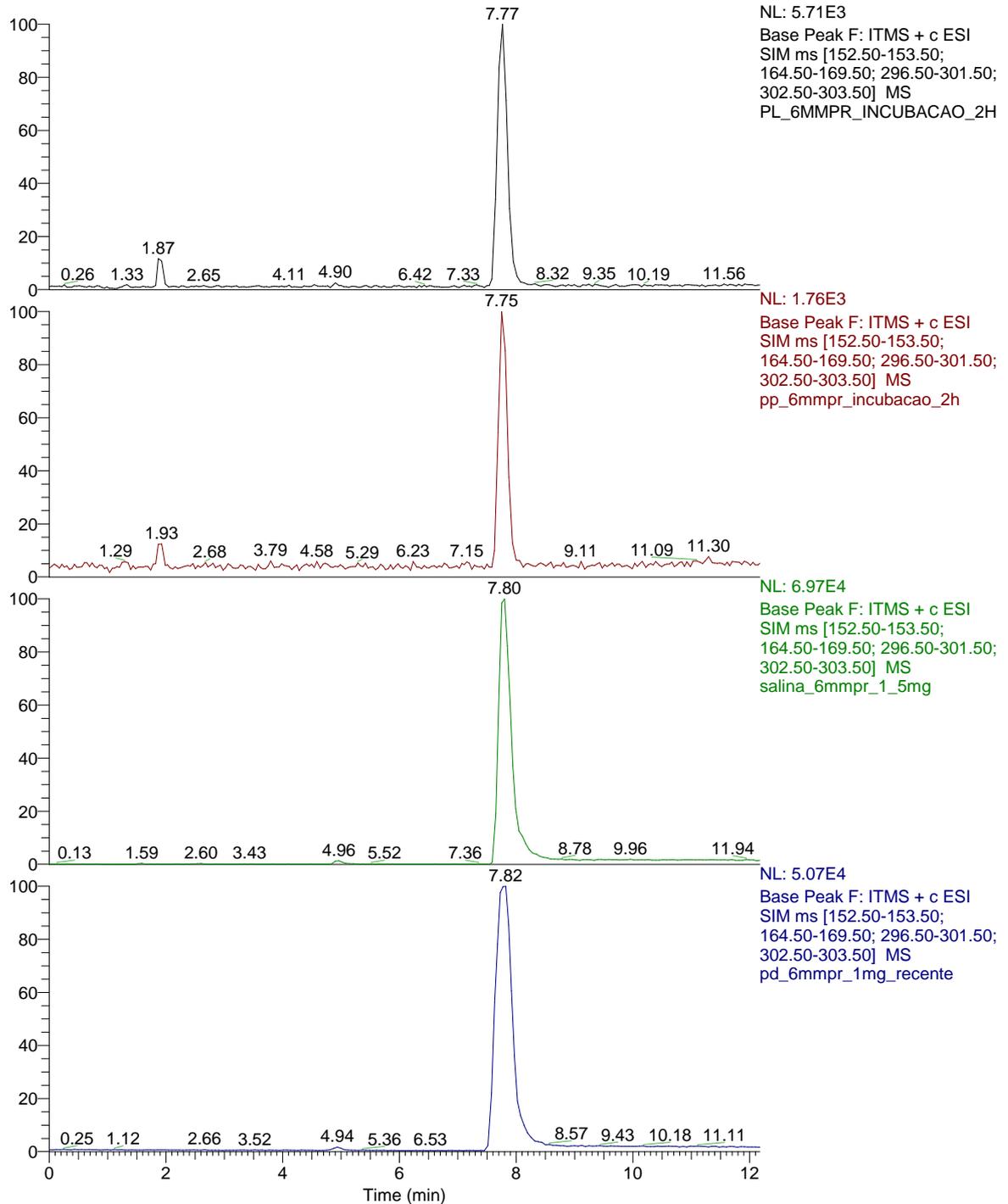


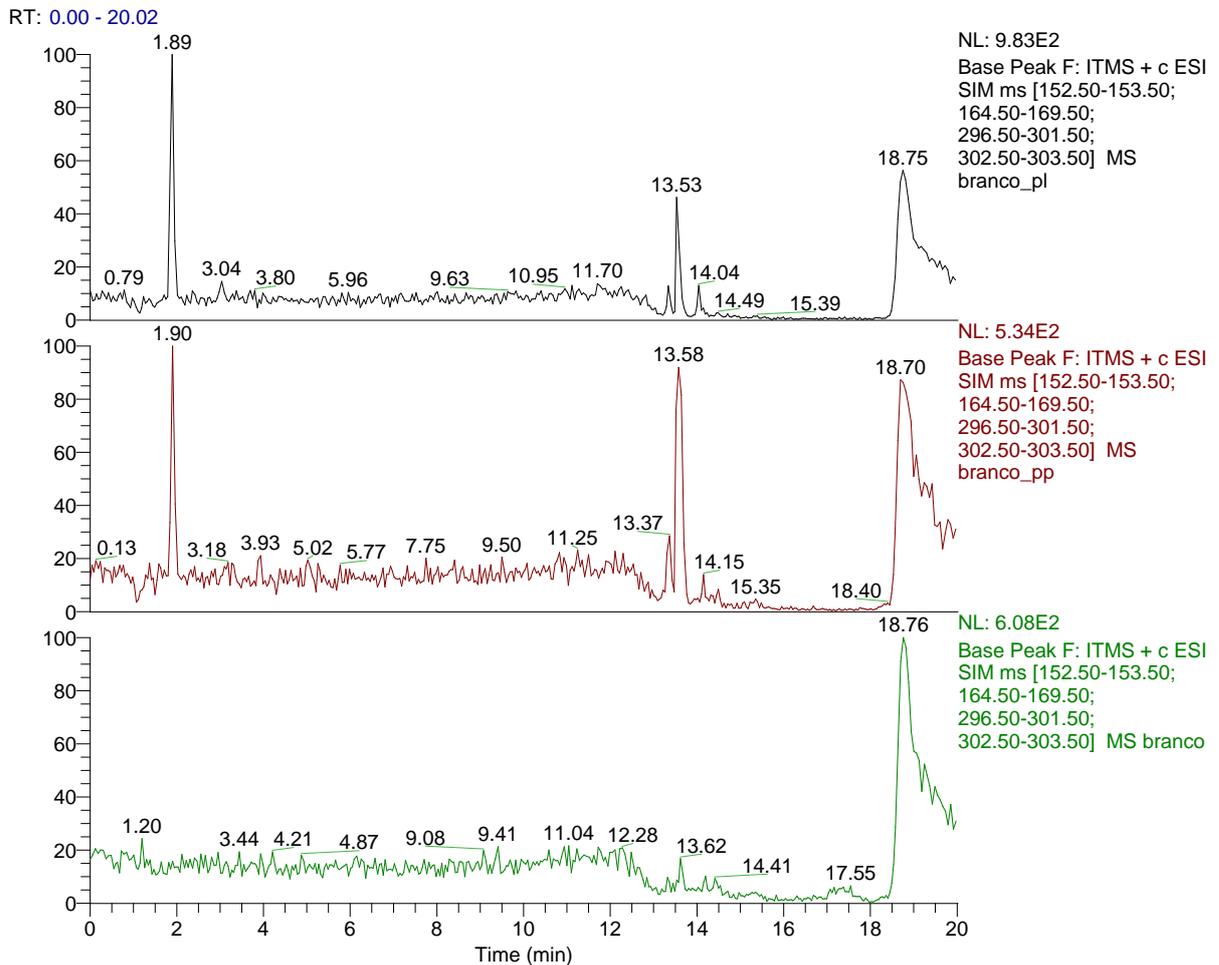
Figura 25 – Cromatogramas referentes aos resultados da incubação da 6-MMPr *in vitro*

RT: 0.00 - 12.17



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMPr = $7,9 \pm 0,2$. Na sequência, de cima para baixo, o cromatograma em preto é referente a amostra da matriz plasma de sangue total dopado com 6-MMPr e incubado por 120 minutos, o cromatograma em vermelho é referente a amostra da matriz papa de hemácias de sangue total dopado com 6-MMPr incubado por 2 horas, o cromatograma em verde é referente a amostra de salina dopada com 6-MMPr utilizada nos tratamentos e o cromatograma em azul é referente a amostra controle de metanol dopado com 6-MMPr. **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 26 – Cromatogramas referentes às amostras branco plasma, branco papa de hemácias e branco metanol, respectivamente

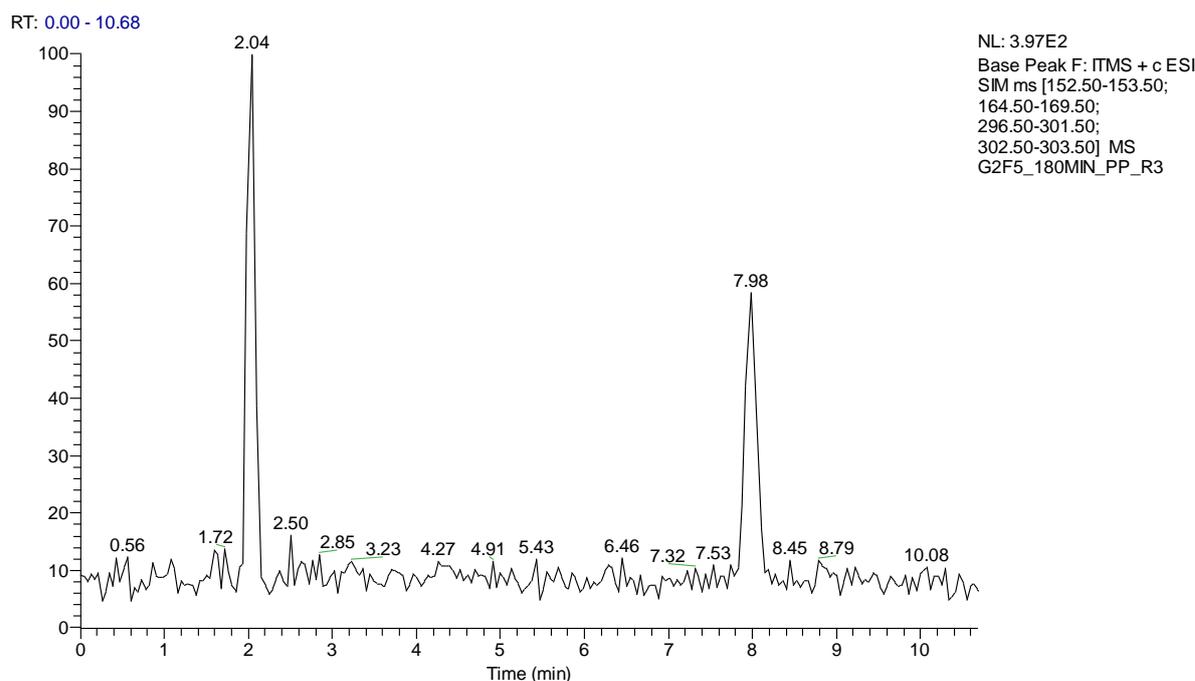


Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento "SIM". Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. Na sequência, de cima para baixo, o cromatograma em preto é referente a amostra da matriz plasma branco, o cromatograma em vermelho é referente a amostra da matriz papa de hemácias branco, o cromatograma em verde é referente a amostra do metanol branco. **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

As análises dos sangues dos animais tratados para construção da curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP_r ao longo do tempo mostrou diferença no perfil da curva cinética de ratas grávidas e não grávidas.

Totalizando um período de 24 horas de monitoramento, em intervalos de 30 minutos até 4 horas pós-tratamento, seguido de um intervalo de 20 horas até a coleta do último ponto (24 horas), formando uma curva cinética de dez pontos, nas ratas grávidas (G2), foi possível observar sinal cromatográfico da 6-MMP_r somente na matriz papa de hemácias, a partir de 90 minutos pós-tratamento, apresentando pico de concentração em 180 minutos seguido de uma queda na concentração até 240 minutos e, após 24 horas, não foi observado sinal cromatográfico da 6-MMP_r, como apresentados nas Figuras 27 e 28.

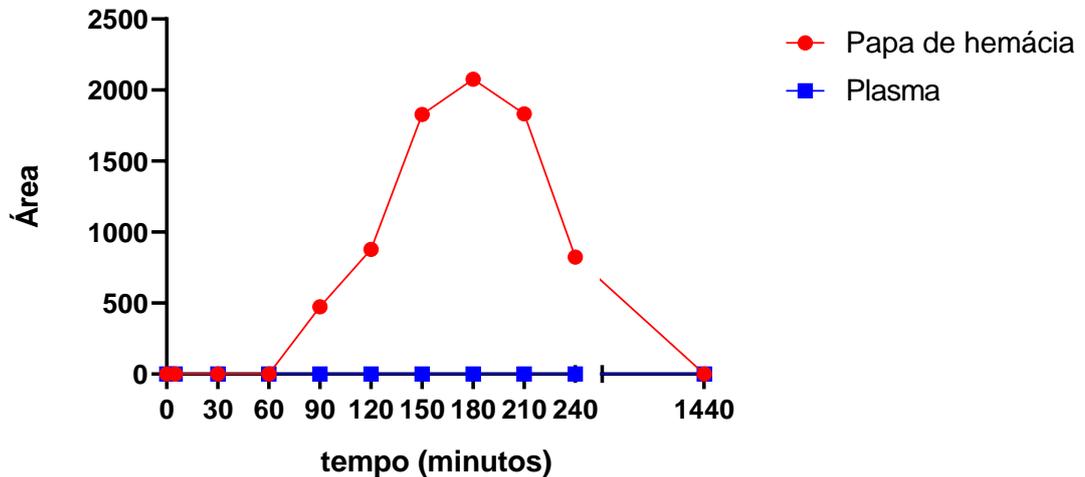
Figura 27 – Cromatograma referente ao ponto 180 minutos pós-tratamento com 6-MMP_r de rata grávida (G2)



Legenda: Análise realizada em modo de monitoramento "SIM". Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. Amostra da matriz papa de hemácias de fêmea do grupo G2 (grávida tratada) referente a 180 minutos pós-tratamento do animal com 15 mg/kg de 6-MMP_r. **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 28 – Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP_r ao longo do tempo em ratas grávidas (G2)

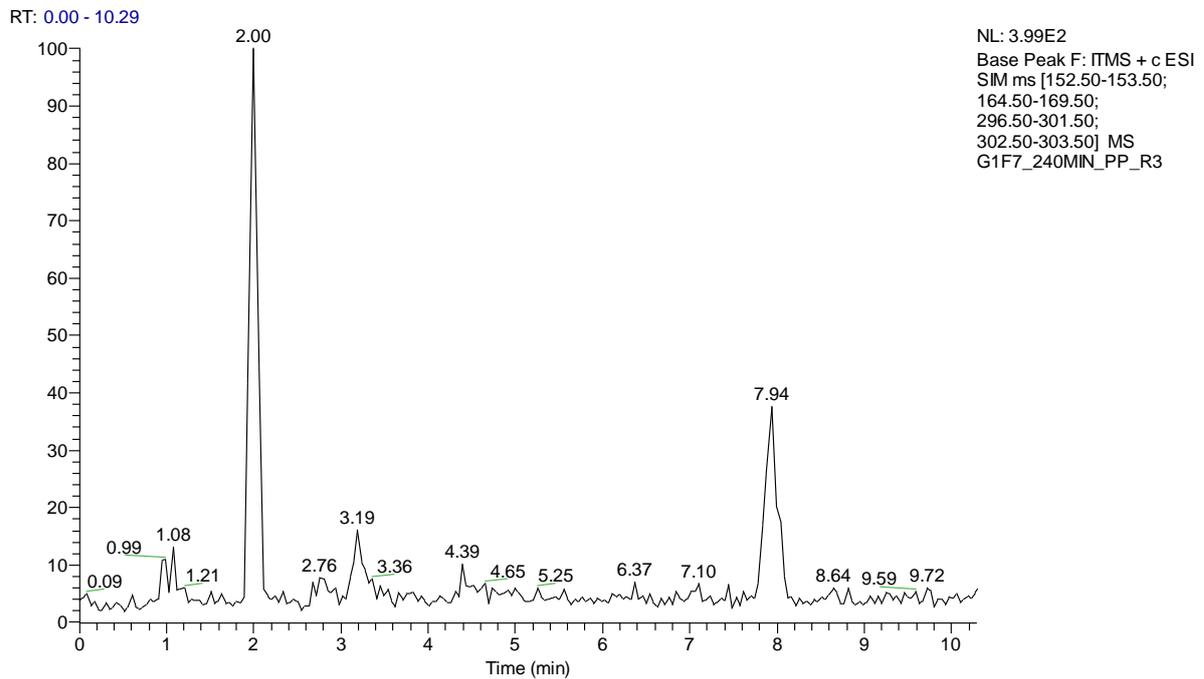
Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP_r ao longo do tempo em ratas grávidas nas matrizes plasma e papa de hemácia



Fonte: Próprio autor, 2023.

Totalizando um período de 24 horas de monitoramento, em intervalos de 30 minutos até 5 horas pós-tratamento, seguido de um intervalo de 1 hora até 6 horas pós-tratamento e um intervalo de 18 horas até a coleta do último ponto (24 horas), formando uma curva cinética de treze pontos, nas ratas não grávidas (G1), foi possível observar sinal cromatográfico da 6-MMP_r somente na matriz papa de hemácias, a partir de 210 minutos pós-tratamento, apresentando pico de concentração em 240 minutos seguido de uma queda na concentração até 360 minutos e, após 24 horas, não foi observado sinal cromatográfico da 6-MMP_r, como apresentados nas Figuras 29 e 30.

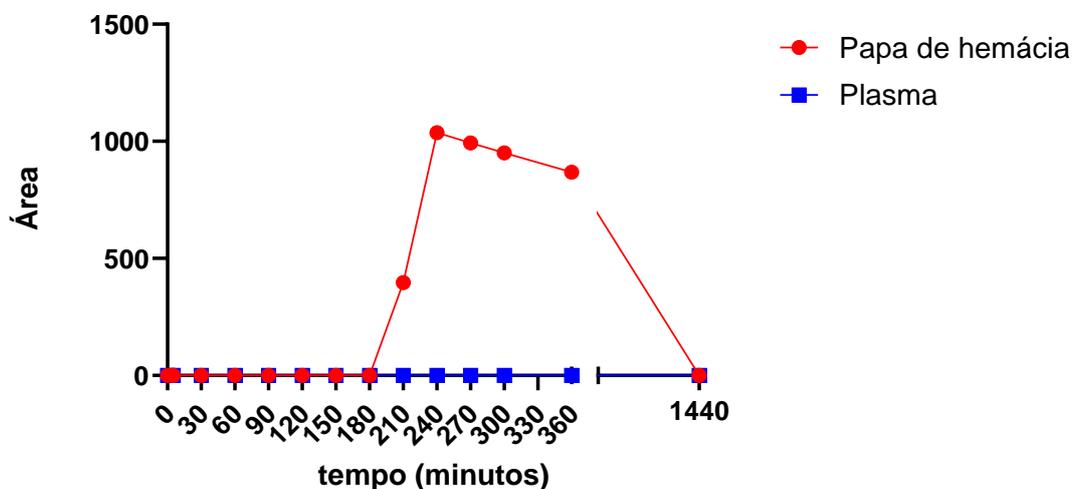
Figura 29 – Cromatograma referente ao ponto 240 minutos pós-tratamento com 6-MMP_r de rata não grávida (G1)



Legenda: Análise realizada em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. Amostra da matriz papa de hemácias de fêmea do grupo G1 (não grávida tratada) referente a 240 minutos pós-tratamento do animal com 15 mg/kg de 6-MMP_r. **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 30 – Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP_r ao longo do tempo em ratas não grávidas (G1)

Curva das alterações dos níveis sanguíneos de 6-MMP_r ao longo do tempo em ratas não grávidas nas matrizes plasma e papa de hemácia

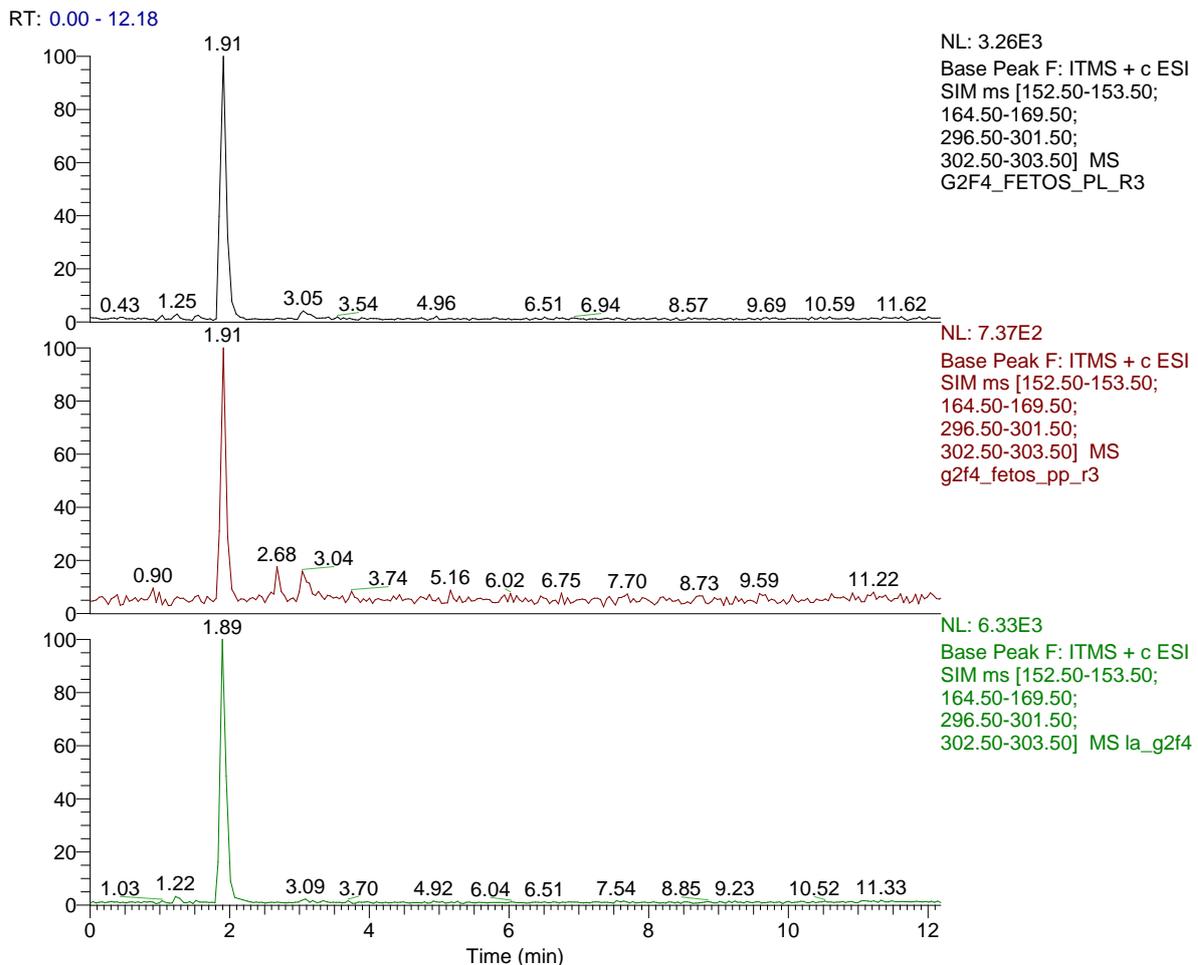


Fonte: Próprio autor, 2023.

5.6 PASSAGEM TRANSPLACENTÁRIA DA 6-MMPR

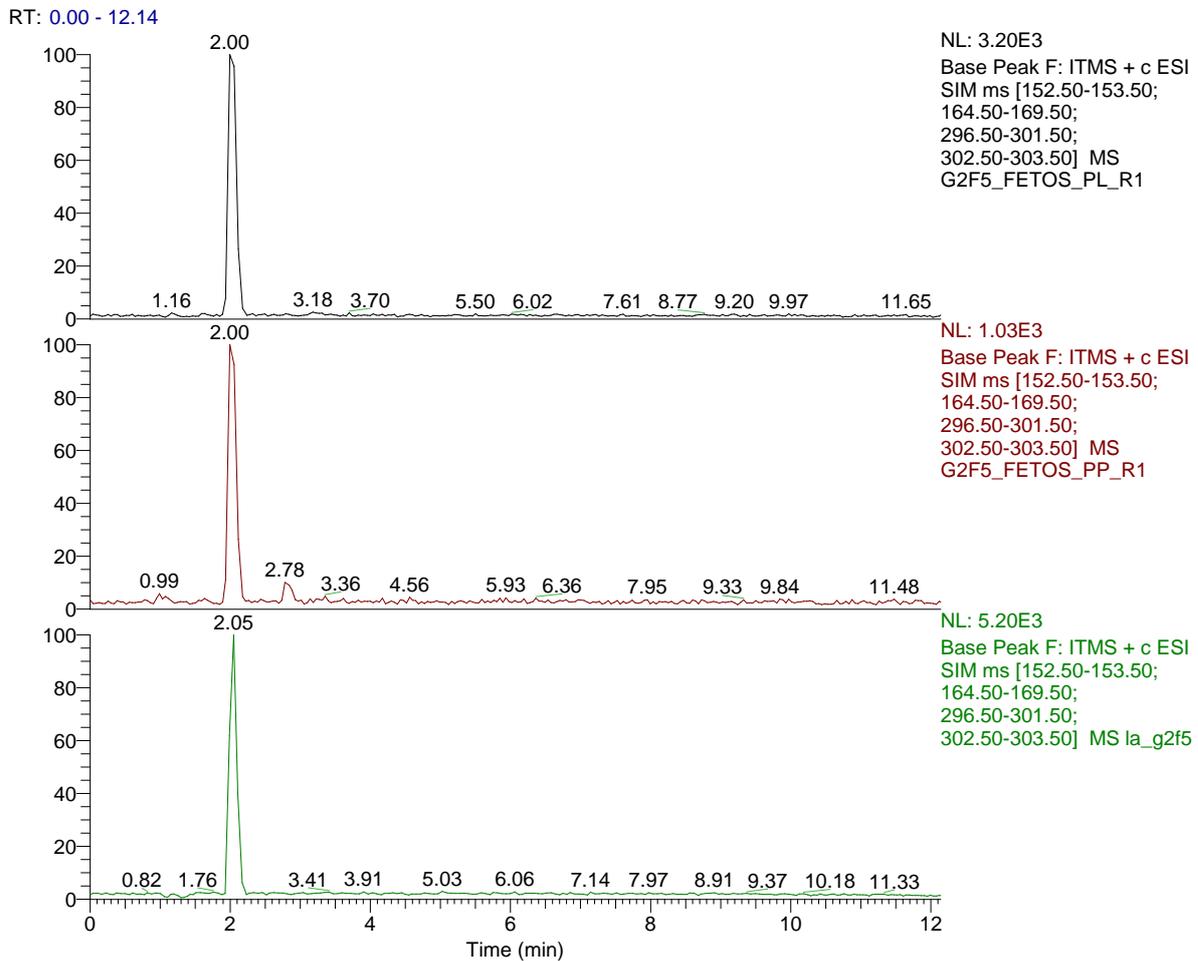
As análises das amostras de sangue (plasma e eritrócitos) dos fetos de mães tratadas com 6-MMPr, coletadas após 120 e 1440 minutos do tratamento, não demonstraram a passagem transplacentária do nucleosídeo. Para complementar o achado, também foram coletadas amostras de líquido amniótico, as quais passaram pelo mesmo processo de extração das matrizes plasma e papa de hemácias. Como apresentado nas figuras 31 e 32, as amostras de líquido amniótico, bem como, as amostras de plasma e papa de hemácias dos fetos não apresentaram sinal cromatográfico da 6-MMPr.

Figura 31 – Cromatogramas referentes às matrizes plasma, papa de hemácias e líquido amniótico de fetos coletados após 120 minutos do tratamento da mãe com 6-MMPr



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMPr = $7,9 \pm 0,2$. Na sequência, de cima para baixo, o cromatograma em preto é referente a amostra 120 minutos da matriz plasma de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada), o cromatograma em vermelho é referente a amostra 120 minutos da matriz papa de hemácias de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada) e o cromatograma em verde é referente a amostra 120 minutos da matriz líquido amniótico de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada). **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

Figura 32 – Cromatogramas referentes às matrizes plasma, papa de hemácias e líquido amniótico de fetos coletados após 1440 minutos do tratamento da mãe com 6-MMP_r



Legenda: Análises realizadas em modo de monitoramento “SIM”. Tempo de retenção da 6-MMP_r = $7,9 \pm 0,2$. Na sequência, de cima para baixo, o cromatograma em preto é referente a amostra 1440 minutos da matriz plasma de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada), o cromatograma em vermelho é referente a amostra 1440 minutos da matriz papa de hemácias de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada) e o cromatograma em verde é referente a amostra 1440 minutos da matriz líquido amniótico de fetos de fêmea do grupo G2 (grávida tratada). **Nota:** O sinal cromatográfico em $1,9 \pm 0,2$ é referente ao padrão interno (DTT). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

6 DISCUSSÃO

A parte inicial desse estudo constituiu no desenvolvimento de um método de extração por precipitação de proteínas, ao que sabemos, inédito. O objetivo do método foi precipitar satisfatoriamente as proteínas do plasma e do concentrado (papa) de hemácias sem a utilização de substâncias que possam favorecer a degradação do analito de interesse, assegurando ser possível trabalhar com o analito íntegro. A recuperação dos analitos com o método estabelecido foi superior a 95% e inferior a 110%, atendendo ao preconizado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8, que estabelece critérios de aceitação para o percentual de recuperação.

Foi necessário desenvolver esse método por serem escassos os estudos que descrevem métodos de quantificação da 6-MMP_r. Além disso, os estudos encontrados que mencionam esse tipo de análise descrevem metodologias de extração complexas e que, na sua grande maioria, envolvem a hidrólise de nucleosídeos e nucleotídeos em suas bases correspondentes para serem, então, separadas e identificadas. Enquanto De Nicolò e colaboradores (2014), utilizam digestão enzimática com fosfatase ácida para converter os metabólitos fosforilados para a forma não fosforilada, Miao e colaboradores (2020) hidrolisam por aquecimento em condições ácidas a 6-MMP_r para formar 6-MMP, semelhante a Derijks e colaboradores (2004) que reportam a medição de tionucleosídeos intracelulares através da obtenção da base livre (6-MMP) por hidrólise ácida do nucleosídeo. Contudo, os autores não mencionam o motivo pelo qual optam por realizar essa conversão. Vale ressaltar que todos os estudos encontrados na literatura coletaram amostras de sangue de pacientes tratados com AZA e desenvolveram metodologias analíticas, no intuito do monitoramento de AZA e seus metabólitos. Nenhum estudo, ao que sabemos, tratou seres vivos diretamente com a 6-MMP_r para avaliar o comportamento do nucleosídeo no organismo.

Dervieux e colaboradores (2005), revelam que a falta de padrões de nucleosídeos de tiopurinas é a principal desvantagem para a quantificação precisa desses nucleosídeos, optando por realizar a conversão dos nucleosídeos de tiopurina em seus respectivos produtos através de hidrólise ácida, esclarecendo que o extrato ácido fornece prótons necessários para hidrolisar termicamente a ligação covalente base-ribose do nucleotídeo de tiopurina. Todavia, seja qual for o motivo, o fato desses estudos de não medirem diretamente a 6-MMP_r, mas a hidrolisarem em 6-MMP para quantificá-la resulta em uma análise imprecisa, não condizente com a realidade *in vivo* e com os propósitos deste estudo. Uma vez que a hidrólise da 6-MMP_r gera a 6-MMP, outro metabólito de AZA, pode-se dizer que embora esses estudos

afirmem dosar a 6-MMP_r, na verdade podem estar superestimando a quantidade de 6-MMP, somando os níveis reais de 6-MMP no sangue com os níveis de 6-MMP_r hidrolisada.

Como a cinética (curso temporal de eliminação) e a biotransformação da 6-MMP_r quando administrada *in vivo* são desconhecidas, e o presente estudo pretende contribuir para esclarecê-los, foi necessário desenvolver um método de extração que não degradasse a molécula de 6-MMP_r. Para desenvolver o método de extração, foi realizado um teste preliminar com base na metodologia de extração de fármacos do plasma descrito por Carmo e colaboradores (2017), utilizando meio ácido para a precipitação de proteínas. O resultado demonstrou que esse método não precipitou satisfatoriamente as proteínas da matriz papa de hemácias. Embora a acidificação tenha sido adequada para precipitar satisfatoriamente as proteínas do plasma, foi observado que o meio ácido provocou a hidrólise parcial da 6-MMP_r. Outros testes demonstraram que quanto mais aumentava-se a acidez do meio, melhor era a precipitação das proteínas em ambas as matrizes; porém, essa precipitação era acompanhada de um aumento proporcional da hidrólise da 6-MMP_r, ou seja, para quantificar a molécula de 6-MMP_r era preciso empregar um meio não acidificado. O método adaptado (não acidificado) de Carmo e colaboradores (2017) não foi eficaz; sendo assim, o presente estudo desenvolveu uma metodologia para extração por precipitação de proteínas inteiramente nova que se mostrou satisfatória, capaz de preservar a 6-MMP_r íntegra até ser analisada.

O método analítico estabelecido nesse estudo permitiu analisar e quantificar independentemente a 6-MMP e a 6-MMP_r no plasma e no concentrado (papa) de hemácias. Como apresentado nos resultados de validação, o método apresentou ótima especificidade / seletividade, linearidade / sensibilidade, precisão e exatidão. Embora a validação da 6-MMP tenha sido realizada de forma parcial, em relação a totalidade dos parâmetros elencados pela ANVISA e INMETRO, os resultados demonstram que para os propósitos desta pesquisa o método foi sensível, preciso, reproduzível e confiável. Os itens faltantes para a validação completa são relevantes para estudos de rotina e não para os propósitos desta investigação experimental controlada. Devido às limitações no tempo disponível para utilizar o equipamento na plataforma analítica, tivemos que abrir mão de alguns parâmetros não fundamentais que pretendemos completar a posteriori. Por esse mesmo motivo, o parâmetro robustez, apresentado no documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8 como sendo opcional, não foi avaliado nas validações.

Apesar do método analítico ter apresentado um bom sinal cromatográfico para a 6-MP, não podemos afirmar que o método é satisfatório para analisar esse analito. Foi observado que o tempo de retenção da 6-MP é muito curto, eluindo aproximadamente após 1

minuto de análise, onde também eluem interferentes de matriz, podendo a 6-MP coeluir com esses interferentes, o que inviabilizaria a quantificação desse sinal cromatográfico. Além disso, durante os testes de extração, foi verificado que a 6-MP não possui boa solubilidade, sendo solúvel apenas em meio alcalino, o que interferiu nos resultados de precipitação de proteínas e tornou o método de extração desenvolvido ineficaz para a 6-MP. Contudo, podemos afirmar que tanto o método de extração quanto o método analítico, com alguns ajustes, podem ser eficazes para analisar essa tiopurina futuramente.

O presente estudo, optou por utilizar a técnica de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplado a técnica de espectrometria de massas (EM), pelo fato dessa combinação oferecer um ótimo desempenho, excelente resolução cromatográfica e uma sensibilidade muito superior a outros métodos confirmatórios, proporcionando resultados de alta qualidade. Uma vez que se pretende investigar e quantificar frações biodisponíveis no compartimento sanguíneo ao longo do tempo e nos compartimentos embrionário e fetal de uma substância, é necessário que o método analítico possua uma ótima sensibilidade e seja capaz de identificar e quantificar níveis mínimos do analito, garantindo um resultado fiel ao verdadeiro.

Os valores encontrados neste estudo para limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da 6-MMP e 6-MMP_r poderiam ser inferiores, aumentando a sensibilidade do método, não fosse o fato da central analítica DPNA proibir o uso de *insert* para *vial*, um pequeno frasco utilizado dentro de um *vial* quando há quantidade limitada de amostra, permitindo o máximo de aproveitamento do volume no momento da injeção cromatográfica. Dessa forma, ao desenvolver o método de extração, foi pensado propositalmente em manter um volume final de sobrenadante que quando diluído com metanol na proporção 1:1, formasse um volume final no *vial* acima de 350 µL, permitindo a injeção da amostra pelo equipamento. É certo que quanto mais diluições, menor será a concentração do analito e, portanto, menor será o sinal cromatográfico e a área correspondente. Todavia, tal limitação não impossibilitou analisar a 6-MMP_r e garantir resultados satisfatórios.

Esse estudo experimental tratou, ao que sabemos, pela primeira vez, animais com a 6-MMP_r no intuito de investigar a cinética do nucleosídeo *in vivo* e obter dados sobre os níveis sanguíneos (plasmáticos e eritrocitários) da 6-MMP_r ao longo do tempo, e determinar a fração biodisponível no compartimento fetal. Os resultados preliminares obtidos são consistentes com a hipótese de que o nucleosídeo, uma vez na corrente sanguínea, tende a se concentrar no interior do eritrócito. A análise simultânea das matrizes plasma e papa de hemácias de animais tratados com a 6-MMP_r mostrou a presença do nucleosídeo apenas na matriz papa de

hemácias. A administração de dose equivalente a 15 mg/kg de 6-MMP_r por via subcutânea nas ratas grávidas resultou em sinais do nucleosídeo no compartimento sanguíneo – especificamente ligado ao eritrócito – começando a aparecer 90 minutos após o tratamento, enquanto nas ratas não grávidas resultou em sinais do nucleosídeo no compartimento sanguíneo – especificamente ligado ao eritrócito – começando a aparecer 210 minutos após o tratamento. Várias hipóteses podem explicar essa diferença no perfil e no tempo inicial da curva cinética de ratas grávidas e não grávidas. Embora seja conhecido que a gravidez provoca mudanças no organismo materno capazes de alterar a cinética de substâncias, é possível que, neste estudo, as ratas grávidas tenham recebido uma dose maior em relação às ratas não grávidas, sendo este um forte fator para a diferença entre as curvas cinéticas. A partir dos resultados obtidos sobre a passagem transplacentária e partindo do princípio de que não há passagem transplacentária da 6-MMP_r, podemos inferir que o nucleosídeo não está sendo distribuído para o compartimento fetal que, por sua vez, contribui de forma significativa para o ganho de peso da mãe. Peso este que foi utilizado para calcular a dose administrada.

Os resultados também evidenciaram que não houve passagem transplacentária detectável do nucleosídeo até 120 e 1440 minutos após a mãe receber uma dose equivalente a 15 mg/kg por via subcutânea. O sangue dos fetos (plasma e eritrócito) e o líquido amniótico não apresentaram sinal cromatográfico do nucleosídeo. Embora a matriz líquido amniótico não tenha sido validada na metodologia, essa matriz é considerada não complexa e, aparentemente, foi bem extraída através da metodologia de extração desenvolvida no presente estudo.

A evidência preliminar de que a 6-MMP_r não alcança o compartimento sanguíneo é consistente com os resultados de estudos anteriores de toxicidade pré-natal. O nucleosídeo é uma molécula polar hidrofílica que requer um sistema de transporte especializado para facilitar a sua passagem para dentro ou fora das células, mas parece não ser um substrato para transportadores de nucleosídeos placentários, como demonstrado nos achados de Neubert *et al.* (1977) e Gomes-Carneiro *et al.* (2022), os quais descrevem que a 6-MMP_r administrada *in vivo* não resultou em toxicidade para a prole mas, do contrário, foi altamente tóxica para a mãe. A mesma molécula, entretanto, foi teratogênica em ensaios *ex vivo* (cultura de brotos de embrião, ou *lim buds*).

Gomes-Carneiro *et al.* (2022), relataram que a administração da 6-MMP_r provocou toxicidade materna dose-dependente dentro de 24 horas de tratamento e que doses múltiplas do nucleosídeo produziram toxicidade cumulativa grave, a partir de 7,5 mg/kg/dia, em ratas não grávidas. Sendo assim, os resultados do presente estudo mostraram a necessidade de

serem feitos novos tratamentos com doses superiores à 15 mg/kg, bem como com doses múltiplas de 7,5 mg/kg.

Os resultados do presente estudo corroboram com a afirmação de Gomes-Carneiro *et al.* (2022) de que o desenvolvimento da 6-MMPr como potencial medicamento antiviral para uso em mulheres grávidas infectadas com o vírus Zika parece altamente improvável, apesar de De Carvalho *et al.* (2017) terem especulado que o nucleosídeo seria um forte candidato a medicamento antiviral para tratar essa infecção. Sabemos que um medicamento antiviral eficaz para combater infecções por ZIK-V deve ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e inibir o vírus, assim como, em gestantes, também deve ser capaz de atravessar a barreira placentária e impedir a replicação do vírus no tecido nervoso do concepto sem apresentar toxicidade para o organismo materno e fetal. Somente se a atividade antiviral e a embriotoxicidade não compartilharem um mecanismo comum seria viável desenvolver agentes antivirais derivados de 6-MMPr eficazes e seguros. Até o momento, as evidências sugerem que a 6-MMPr além de provocar elevada toxicidade para o organismo materno, não é biodisponível no compartimento fetal, inviabilizando o seu uso como antiviral no tratamento de infecções por vírus Zika.

7 CONCLUSÃO

- ✓ O método de extração por precipitação de proteínas estabelecido neste estudo para a 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMP_r) e para a 6-metil-mercaptopurina (6-MMP) foi satisfatório com recuperação dos analitos superior a 95% e inferior a 110% (valores entre 80% e 115% – preconizado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8).
- ✓ O método analítico estabelecido neste estudo para a 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMP_r) e para a 6-metil-mercaptopurina (6-MMP) apresentou seletividade adequada, boa linearidade ($R^2 > 0,99$ – preconizado pela RDC nº 166, de 24/07/2017 da ANVISA), boa precisão (coeficiente de variação inferior a 15% – preconizado pela resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA) e boa exatidão (valores entre 80% e 115% – preconizado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8). Os limites de detecção e de quantificação obtidos demonstraram boa sensibilidade.
- ✓ Os padrões de 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMP_r) e 6-metil-mercaptopurina (6-MMP) quando em solução diluídos em metanol e armazenados a -20°C , não apresentaram boa estabilidade, sendo recomendado o uso dessas soluções por no máximo 30 dias.
- ✓ Os resultados desse estudo são consistentes com a hipótese de que o nucleosídeo, uma vez na corrente sanguínea, tende a se concentrar no interior do eritrócito.
- ✓ A administração da 6-MMP_r (15 mg/kg) por via subcutânea nas ratas grávidas resultou em sinais do nucleosídeo no concentrado (papa) de hemácias a partir de 90 minutos após o tratamento, apresentando pico de concentração em 180 minutos, enquanto no plasma não foi observado sinal do nucleosídeo em todos os tempos monitorados.
- ✓ A administração da 6-MMP_r (15 mg/kg) por via subcutânea nas ratas não grávidas resultou em sinais do nucleosídeo no concentrado (papa) de hemácias a partir de 210 minutos após o tratamento, apresentando pico de concentração em 240 minutos, enquanto no plasma não foi observado sinal do nucleosídeo em todos os tempos

monitorados.

- ✓ Os resultados evidenciaram que não houve passagem transplacentária detectável do nucleosídeo em 120 e 1440 minutos após a mãe receber uma dose equivalente a 15 mg/kg por via subcutânea.

- ✓ Até o momento, as evidências sugerem que a 6-MMPr além de provocar elevada toxicidade para o organismo materno, não é biodisponível no compartimento fetal, inviabilizando o seu uso como antiviral no tratamento de infecções por vírus Zika.

REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/doi-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 30 jun. 2023.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. Acesso em: 30 jun. 2023.
- BARREIROS, A. L. B. S; BARREIROS, L. M. **Química de biomoléculas**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, CESAD, 2012.
- BELIZNA, C., MERONI, P. L., SHOENFELD, Y., DEVREESE, K., ALIJOTAS-REIG, J., ESTEVE-VALVERDE, E. *et al.*. In utero exposure to Azathioprine in autoimmune disease. Where do we stand? **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 9, 102525, 2020. Doi: 10.1016/j.autrev.2020.102525
- CARMO, A. P. B. D., FERNANDES, M. S. B., RIBEIRO, S., DE-OLIVEIRA, A. C. X., PAUMGARTTEN, F. J. R., MOREIRA, D. L. A newly validated high-performance liquid chromatography method with diode array ultraviolet detection for analysis of the antimalarial drug primaquine in the blood plasma. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 499–505, 2017. Doi 10.1590/0037-8682-0023-2017
- DE CARVALHO, O. V., FÉLIX, D. M., DE MENDONÇA, L. R., DE ARAÚJO, C. M. C. S., DE OLIVEIRA FRANCA, R. F., CORDEIRO, M. T., SILVA JÚNIOR, A., PENA, L. J. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptapurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 6, p. 718–725, 2017. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.016
- DE NICOLÒ, A., AGNESOD, D., SIMIELE, M., RIGANÒ, D., ADRIANI, A., CANAPARO, R., ASTEGIANO, M., RIZZETTO, M., DI PERRI, G., D'AVOLIO, A. UPLC-MS/MS method for quantification of the azathioprine metabolites 6-mercaptoguanosine and 6-methylmercaptapurine riboside in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 98, p. 271–278, 2014. Doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.040
- DERIJKS, L. J., GILISSEN, L. P., ENGELS, L. G., BOS, L. P., BUS, P. J., LOHMAN, J. J., CURVERS, W. L., VAN DEVENTER, S. J., HOMMES, D. W., & HOOYMANS, P. M. Pharmacokinetics of 6-mercaptapurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. **Therapeutic drug monitoring**, v. 26, n. 3, p. 311–318, 2004. Doi: 10.1097/00007691-200406000-00016
- DERVIEUX, T., MEYER, G., BARHAM, R., MATSUTANI, M., BARRY, M., BOULIEU, R., NERI, B., & SEIDMAN, E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptapurine therapy. **Clinical**

chemistry, v. 51, n. 11, p. 2074–2084, 2005. Doi: 10.1373/clinchem.2005.050831

EYER, L., NENCKA, R., HUVAROVÁ, I., PALUS, M., JOAO ALVES, M., GOULD, E. A., DE CLERCQ, E., RŮŽEK, D. (2016). Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 5, p. 707–711, 2016. Doi: 10.1093/infdis/jiw226

FRANCA, R., BRAIDOTTI, S., STOCCO, G., DECORTI, G. Understanding thiopurine methyltransferase polymorphisms for the targeted treatment of hematologic malignancies. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 17, n. 10, p. 1187–1198, 2021. Doi: 10.1080/17425255.2021.1974398

GOMES-CARNEIRO, M. R., DE CARVALHO, R. R., DO AMARAL, T. F., XAVIER DE-OLIVEIRA, A. C. A., PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of the maternal and developmental toxicity of 6-methylmercaptapurine riboside in rats. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 111, p. 158–165, 2022. Doi: 10.1016/j.reprotox.2022.05.015

GOLAN, D. E. TASHJIAN JUNIOR, A. H., ARMSTRONG, E. J., ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HOOD, R. D. **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**. 3.ed. New York: Informa Healthcare, 2012.

HOOVER, S., & STRIKER, R. Thiopurines inhibit bovine viral diarrhea virus production in a thiopurine methyltransferase-dependent manner. **The Journal of general virology**, v. 89, pt 4, p. 1000–1009, 2008. Doi: 10.1099/vir.0.83381-0

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de Métodos analíticos**. Revisão 08, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf. Acesso em: 30 jun. 2023.

KUMAR, A., SAINI, G., NAIR, A., SHARMA, R. UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 69, n. 3, p. 371–380, 2012. PMID: 22594250

LAMANNA, N., & WEISS, M. Purine analogs in leukemia. **Advances in pharmacology** (San Diego, Calif.), v. 51, p. 107–125, 2004. Doi: 10.1016/S1054-3589(04)51005-0

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 2. ed. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LANÇAS, F. M. **Espectrometria de massas: fundamentos, instrumentação e aplicações**. Campinas: Editora Átomo, 2019.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? II. a escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n 1, p. 27-46, 2013. Doi:10.4322/sc.2013.005

LIM, P. Y., KEATING, J. A., HOOVER, S., STRIKER, R., BERNARD, K. A. A thiopurine

drug inhibits West Nile virus production in cell culture, but not in mice. **PloS one**, v. 6, n. 10, e26697, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0026697

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. UHPLC uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197–207, 2012. Doi: 10.4322/sc.2012.014

MARSTON A. (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2786–2798, 2007. Doi: 10.1016/j.phytochem.2007.08.004

MIAO, Q., BAI, Y. J., ZHANG, J. L., LI, Y., SU, Z. Z., YAN, L., WANG, L. L., & ZOU, Y. G. (2020). Highly sensitive and rapid determination of azathioprine metabolites in whole blood lysate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1136: 121802. Doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121802

MOREAU, R. L. M., & SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. **6-methylmercaptapurine riboside**. CID 9570. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Methylmercaptapurine-riboside>. Acesso em: 30 jun. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. **6-methylmercaptapurine**. CID 5778. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5778>. Acesso em: 30 jun. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. **6-mercaptapurine**. CID 667490. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/667490>. Acesso em: 30 jun. 2023.

NEUBERT D, LESSMÖLLMANN U, HINZ N, DILLMANN I, FUCHS G. Interference of 6-mercaptapurine riboside, 6-methylmercaptapurine riboside and azathioprine with the morphogenetic differentiation of mouse extremities in vivo and in organ culture. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.298, n. 2, p. 93–105, 1977. Doi:10.1007/BF00508616

OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: Teoria e Prática**. 5. ed. Campinas: Millenium, 2018.

PAUMGARTTEN F. J. R. On the antiviral activity and developmental toxicity of 6-methylmercaptapurine riboside (6MMP_r). **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 5, p. 695–696, 2017. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.003

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ROBINSON, J. W.; FRAME, E. M. S.; FRAME II, G. M. **Undergraduate Instrumental Analysis**. 6th edition, New York: Marcel Dekker, 2005.

SKOOG, D. A; HOLLER, J. F; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, v. 5, p. 642-667, 2002.

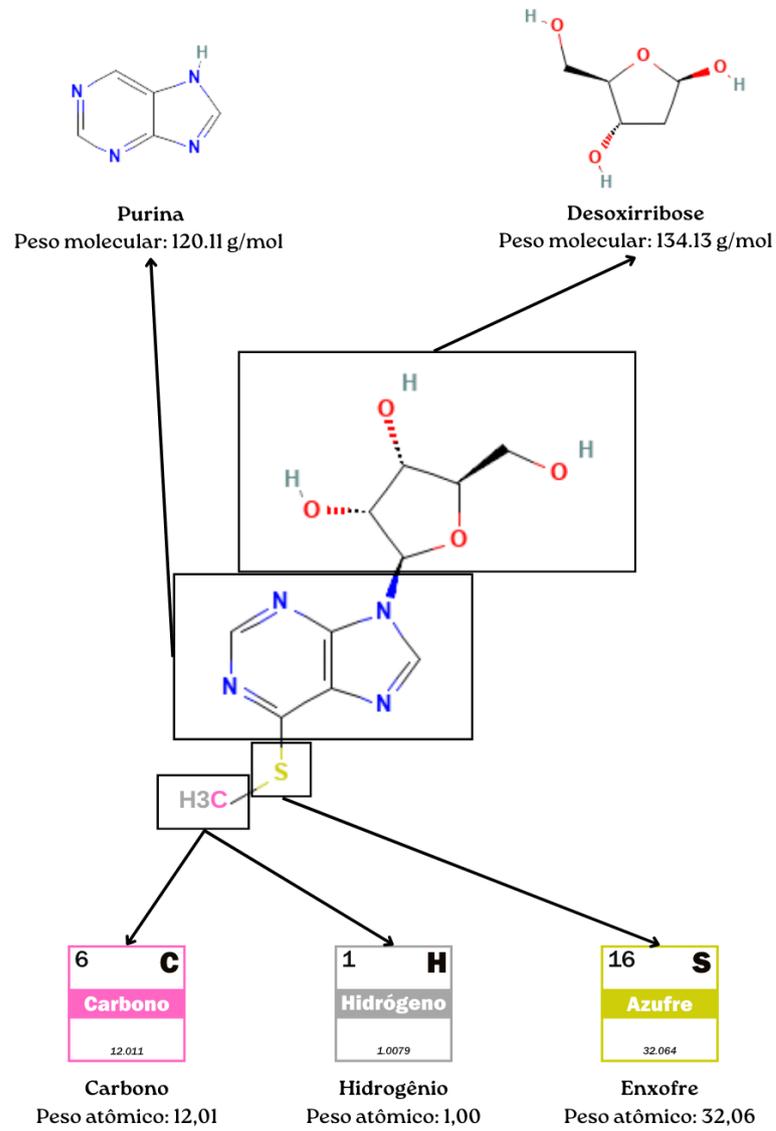
SOUSA, P., ESTEVINHO, M. M., DIAS, C. C., MINISTRO, P., KOPYLOV, U., DANESE, S., PEYRIN-BIROULET, L., MAGRO, F. Thiopurines Metabolites and Drug Toxicity: A Meta-Analysis. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 7, p. 2216, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9072216>

TIEDE, I; FRITZ, G.; STRAND, S., *et al.*. CD28-dependent Rac-1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4 + T lymphocytes. **The Journal of clinical investigation.**, v. 111, n. 8, p. 1133-1145, 2003. Doi: 10.1172/JCI16432

VAN SCOIK, K. G., JOHNSON, C. A., PORTER, W. R. The pharmacology and metabolism of the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and azathioprine. **Drug metabolism reviews**, v. 16, n. 1-2, p. 157–174, 1985. Doi: 10.3109/03602538508991433

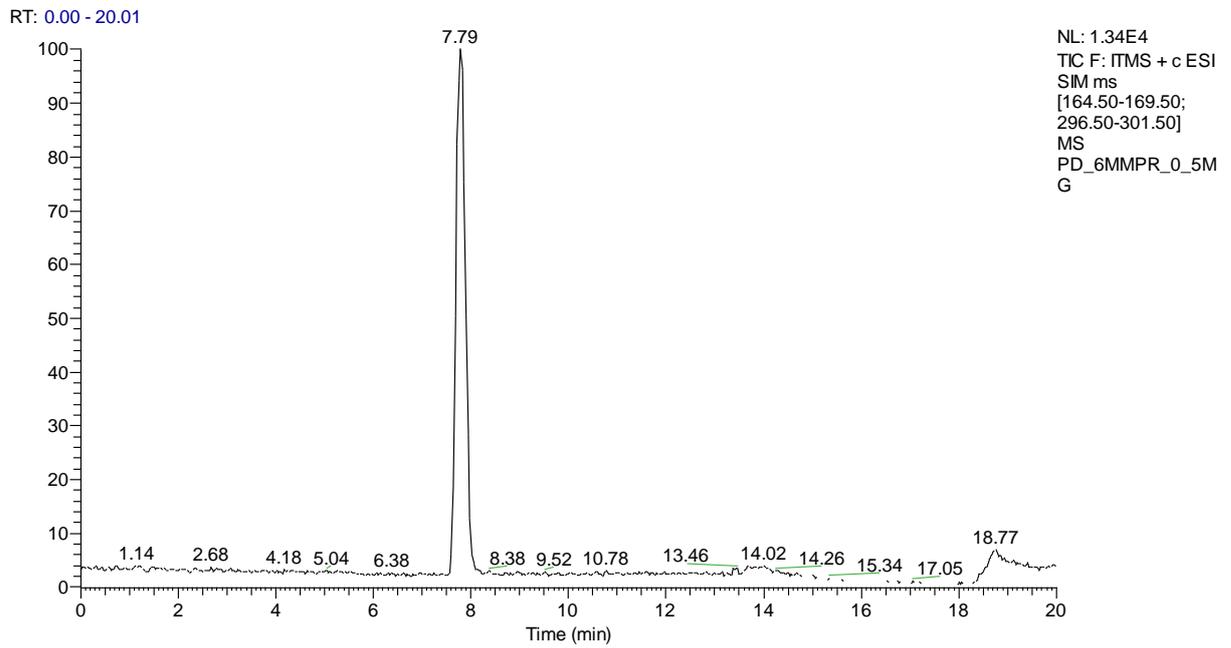
WILSON, J. G., FRASER, F. C. **Handbook of Teratology**: General Principles and Etiology. New York: Plenum Publishing, 1977.

APÊNDICE A – FIGURA DA 6-MMPR DETALHADA QUIMICAMENTE



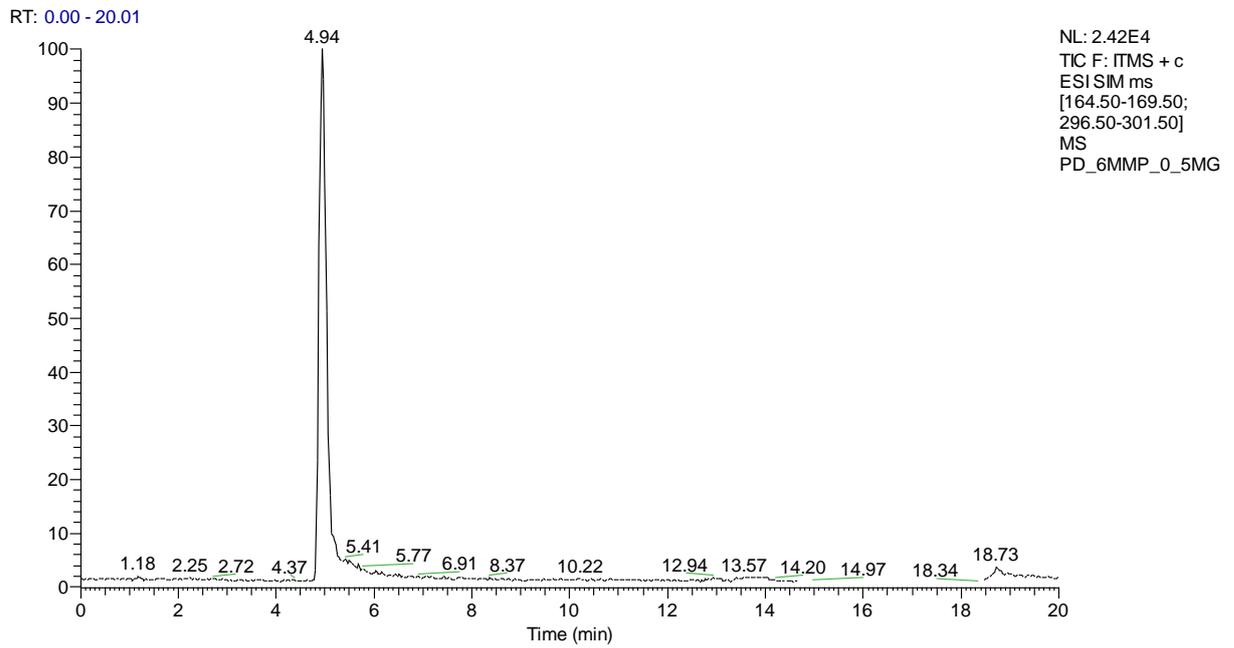
Fonte: Próprio autor, 2023.

**APÊNDICE B – CROMATOGRAMA AMPLIADO DA 6-MMPR EM METANOL NA
CONCENTRAÇÃO 0,5 MG/ML**



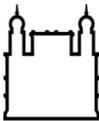
Fonte: Próprio autor, 2023.

**APÊNDICE C – CROMATOGRAMA AMPLIADO DA 6-MMP EM METANOL NA
CONCENTRAÇÃO 0,5 MG/ML**



Fonte: Próprio autor, 2023.

APÊNDICE D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DESENVOLVIDO NESSE ESTUDO

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz</p>	<p>Laboratório de Toxicologia Ambiental - DCB / ENSP / FIOCRUZ</p>
DOCUMENTO: Instrução de Trabalho	
TÍTULO: Método de extração da 6-MMP e 6-MMP_r por precipitação de proteínas	
Criação do Documento: 26/08/2023	
Elaborado por: Manoella Santos de Borborema Fernandes	

1. OBJETIVO

Este procedimento tem por objetivo descrever detalhadamente os processos do método de extração da 6-metil-mercaptopurina (6-MMP) e da 6-metil-mercaptopurina ribosídeo (6-MMP_r) por precipitação de proteínas nas matrizes plasma e concentrado (papa) de hemácias desenvolvido por Fernandes, M. S. B. (2023).

2. SOBRE O MÉTODO

O objetivo do método é precipitar satisfatoriamente as proteínas do plasma e do concentrado (papa) de hemácias sem a utilização de substâncias que possam favorecer a degradação do analito de interesse, assegurando ser possível trabalhar com o analito íntegro. Neste método, a recuperação dos analitos foi superior a 95% e inferior a 110%, atendendo ao preconizado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 04/2020, revisão nº 8, que estabelece critérios de aceitação para o percentual de recuperação.

O método compreende três etapas. A primeira utiliza solução de DTT na concentração 0,1M, o qual confere proteção aos grupos tiol (SH) e reduz pontes dissulfeto em peptídeos e proteínas. A segunda utiliza metanol como agente precipitante de proteínas. A terceira utiliza clorofórmio que desnatura as proteínas e as torna insolúveis na fase aquosa, onde encontra-se o analito. Ao final do processo, formam-se três fases, onde o precipitado encontra-se no meio, fase aquosa na superfície e a fase orgânica no fundo.

3. MATERIAIS

- ✓ Ditioneitol, peso molecular 154,25 g/mol;
- ✓ Metanol, peso molecular 32,04 g/mol;
- ✓ Clorofórmio, peso molecular 32,04 g/mol;
- ✓ Água ultrapura;
- ✓ Centrífuga;
- ✓ Vortex;
- ✓ Pipeta automática 20µL - 200µL;
- ✓ Tubo do tipo *ependorf* com capacidade de 1,5mL;
- ✓ Vial de vidro.

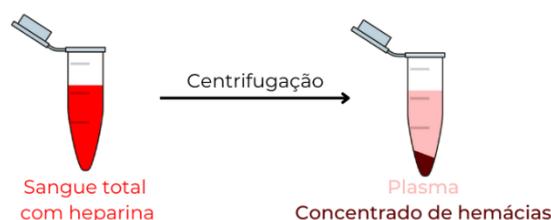
4. SOLUÇÃO DE DTT 0,1M

Pesar X g de DTT (peso molecular 154,25 g/mol) e diluir em Y mL de água ultrapura. Devido à instabilidade do DTT em solução, foi estabelecido que essa solução seja armazenada entre 2 - 8 °C por no máximo 7 dias.

X	Y
0,01542g de DTT _____	1mL de H ₂ O
0,04626g de DTT _____	3mL de H ₂ O
0,0771g de DTT _____	5mL de H ₂ O

5. SEPARAÇÃO DAS MATRIZES

Para separar as matrizes, no mesmo dia, após as coletas de sangue em tubo tipo *ependorf* com capacidade de 1,5 mL contendo 20 µL de anticoagulante heparina, o sangue total é centrifugado na condição 12.000 x g (RCF) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, há a formação de duas fases, onde o sobrenadante líquido é o plasma e o precipitado denso é o concentrado de hemácias.



Todo plasma é retirado cuidadosamente e transferido para outro tubo *ependorf* que será imediatamente armazenado e congelado a -20°C para ser extraído posteriormente. Após a retirada do plasma, com auxílio de uma pipeta automática, $100\ \mu\text{L}$ do concentrado de hemácias é retirado do fundo do tubo (por ser uma matriz altamente densa, o volume é retirado lentamente) e transferido para outro tubo *ependorf* que receberá em seguida $300\ \mu\text{L}$ de água ultrapura para realizar uma diluição 1:4 e será agitado no vórtex, em velocidade forte, por no mínimo 30 segundos, para lisar (romper) as hemácias. Após diluição e lise das hemácias, a amostra é armazenada e congelada a -20°C para ser extraída posteriormente.

6. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

- a. Transferir **$50\ \mu\text{L}$ da matriz** (plasma / papa de hemácias) para um tubo do tipo *ependorf* com capacidade de $1,5\text{mL}$;
- b. Adicionar ao *ependorf* **$50\ \mu\text{L}$ da solução de DTT $0,1\text{M}$** ;
- c. Agitar a amostra (matriz + DTT) no vórtex, em velocidade média, por 30 segundos;
- d. Adicionar ao *ependorf* **$150\ \mu\text{L}$ da solução de metanol**;
- e. Agitar a amostra (matriz + DTT + metanol) no vórtex, em velocidade média, por 30 segundos;
- f. Adicionar ao *ependorf* **$50\ \mu\text{L}$ da solução de Clorofórmio**;
- g. Agitar a amostra (matriz + DTT + metanol + clorofórmio) no vórtex, em velocidade forte, por 30 segundos;
- h. Centrifugar a amostra na condição $12.000\ \times\ g$ por 15 minutos em temperatura ambiente;
- i. Após a separação das fases por centrifugação, transferir $200\ \mu\text{L}$ do sobrenadante para um vial;
- j. Adicionar $200\ \mu\text{L}$ de metanol no vial contendo o sobrenadante da amostra para realizar uma diluição 1:1 e conseguir um volume final de $400\ \mu\text{L}$.

7. ARMAZENAGEM DA AMOSTRA EXTRAÍDA

Vedar o vial contendo a amostra com película flexível Parafilm. Após a vedação, armazenar a amostra a -20°C por no máximo 7 dias.