IGOR RAFAEL DOS SANTOS MAGALHÃES

**Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma:
avaliação da técnica de microextração em fase líquida**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato.

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Magalhães, Igor Rafael dos Santos.

Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma: avaliação da técnica de microextração em fase líquida. Ribeirão Preto, 2006.

121 f.: il.; 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

1. enantiômeros da mefloquina. 2. cromatografia líquida. 3. microextração em fase líquida. 4. plasma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Igor Rafael dos Santos Magalhães

Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma: avaliação da técnica de microextração em fase líquida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato.

Aprovado em 28 de julho de 2006

Banca Examinadora

Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato (Orientadora e Presidente)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Instituto de Química - UNICAMP

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Alzerita e Antonio Carlos Magalhães, pelo carinho, ensinamentos, incentivo e por estarem sempre presentes em minhas conquistas;

À minha amada Karen, responsável por várias mudanças em minha vida, culminando na realização deste trabalho. A certeza de nossa eterna união e do amor que ampara meus passos, estarão sempre assegurando meus ideais.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico e intelectual.

Aos colegas do laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC), pela colaboração e momentos proporcionados durante a realização deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios de Química Inorgânica e de Toxicologia, pela atenção e auxílio proporcionados.

Ao laboratório de Farmacologia, em especial à Profa. Dra. Lusiane Bendhack, Míriam Contin e Juliana Vercesi, pelo auxílio durante a aplicação do método.

Aos funcionários do departamento de Física e Química, em particular da Química Analítica: Maria Perpétua Del Lama, Luiz Carlos Feiteiro, Valquíria Jabor, Rosana Frangiosi, Roberto de Carvalho e Solange De Santis pela colaboração e apoio técnico.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Rosana Florêncio, Ana Lúcia Turatti e Eleni Passos, pela atenção em todos os momentos.

À família Taveira (Tia Irecê, Andréa e Adriana), a qual constituiu nossa família amazonense em Ribeirão Preto, pela atenção, amor e carinho.

A todos os amigos que fiz em Ribeirão Preto, pela amizade, apoio e incentivo durante a pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“O futuro do homem não está nas estrelas, mas sim na sua vontade”

William Shakespeare

RESUMO

MAGALHÃES, I. R. S. **Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma: avaliação da técnica de microextração em fase líquida.** 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A mefloquina (MQ), fármaco utilizado na profilaxia e tratamento da malária ocasionada por *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, é comercializada na forma racêmica. Apresenta disposição cinética estereosseletiva e ação farmacológica diferencial entre os enantiômeros. A maioria dos métodos analíticos desenvolvidos para análise do fármaco em plasma utiliza como técnicas de preparação das amostras, a extração líquido-líquido ou a extração em fase sólida. Por outro lado, a microextração em fase líquida (LPME), técnica recentemente desenvolvida, pode oferecer resultados bastante satisfatórios para amostras complexas, como fluidos biológicos. Portanto, o presente trabalho teve por finalidade o desenvolvimento e validação de um método analítico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fases estacionárias quirais juntamente com a LPME para a análise enantiosseletiva da MQ em plasma. Empregando-se a coluna Chiralpak AD com fase móvel constituída por hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v/v), obteve-se a separação dos enantiômeros da MQ, com tempos de retenção reduzidos e resolução apropriada. Utilizando-se uma membrana capilar de polipropileno, juntamente com éter diexílico (fase orgânica) e ácido perclórico 10 mmol L⁻¹ (fase aceptora) como componentes do sistema de três fases, obteve-se excelente isolamento dos interferentes endógenos aliado a um enriquecimento satisfatório dos analitos, sendo então possível a validação do método

desenvolvido. A metodologia otimizada apresentou linearidade satisfatória no intervalo de 50 – 1500 ng mL⁻¹ com coeficientes de determinação > 0,998 para ambos enantiômeros. Os valores de recuperação absoluta de (-)-(SR)-MQ e (+)-(RS)-MQ foram 33,2% e 35,0%, respectivamente. Precisão e exatidão, avaliadas por estudos intra-ensaio e interensaio, foram < 15% para ambos enantiômeros. Além disso, não foram observadas racemização ou degradação do fármaco durante a preparação das amostras e análise cromatográfica. Posteriormente, o método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo-piloto de disposição cinética em ratos. Verificou-se que a disposição cinética da MQ em ratos foi estereosseletiva, já que maiores concentrações de (+)-(RS)-MQ foram obtidas em todos os tempos de análise avaliados.

Palavras-chave: enantiômeros da mefloquina, plasma, cromatografia líquida de alta eficiência, microextração em fase líquida.

ABSTRACT

MAGALHÃES, I. R. S. **Enantioselective analysis of mefloquine in plasma: evaluation of the liquid-phase microextraction technique**. 2006. 120 p. Dissertation (Master's Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Mefloquine (MQ), a drug used for prophylaxis and treatment of malaria caused by chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*, is commercialized as a racemic mixture. MQ enantiomers demonstrate differential stereoselective dispositions and pharmacodynamic actions. The majority of methods developed for the determination of mefloquine in plasma includes liquid-liquid or solid-phase extraction as sample preparation. On the other hand, liquid-phase microextraction (LPME), a recently developed technique, may offer satisfactory results for complex matrices, such as biological fluids. Therefore, the aim of this work was to develop and validate an analytical method using chiral high-performance liquid chromatography combined with LPME for the enantioselective analysis of MQ in plasma. Employing a Chiralpak AD column with hexane/ethanol/DEA (97:3:0.05, v/v/v) as mobile phase, separation of MQ enantiomers was achieved with short retention times and appropriate resolution. Using a polypropylene-based capillary membrane together with di-*n*-hexyl ether (organic phase) and 10 mmol L⁻¹ perchloric acid (acceptor phase) as components of a three-phase system, an excellent clean-up of endogenous interferences, allied with a satisfactory enrichment of analytes, was obtained, which allowed method validation. The optimized methodology exhibited good linearity over a 50 - 1500 ng mL⁻¹ range with correlation coefficients of > 0.998 for both enantiomers. The mean recoveries of (-)-(SR)-MQ and (+)-(RS)-MQ

were 33.2 and 35.0%, respectively. Precision and accuracy, demonstrated by within-day and between-day assays, were lower than 15% for both enantiomers. Furthermore, no racemization or degradation were seen during sample preparation and chromatographic analysis. Finally, the developed and validated method was applied to a pilot pharmacokinetic assay in rats. An enantioselective kinetic disposition of MQ enantiomers was observed in rat plasma, as concentrations of (+)-(RS)-MQ were greater than its antipode at all measured times.

Keywords: mefloquine enantiomers, liquid-phase microextraction, high-performance liquid chromatography, plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de interação fármaco-receptor, segundo a “teoria dos três pontos” (Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE, 2001).	21
Figura 2. Principais modos empregados em SPME: extração direta (A) e extração via <i>headspace</i> (B).	29
Figura 3. Representação esquemática do transporte através de membranas (Adaptado de CORDERO et al., 2000).	30
Figura 4. Esquema do processo de extração líquida suportada por membranas para compostos de caráter básico (B), ácido (A) e neutros (N)(Adaptado de JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999).	33
Figura 5. Esquema do processo de extração líquido-líquido em membrana microporosa (Adaptado de JÖNSSON & MATHIASSEN, 1999).	34
Figura 6. Representação esquemática da SDME (Adaptado de JEANNOT; CANTWELL, 1997).	36
Figura 7. Membrana capilar de polipropileno utilizada em LPME.	37
Figura 8. Configuração em “U”, empregada na LPME.	38
Figura 9. Modos de extração utilizados em LPME (Adaptado de PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).	39
Figura 10. Estrutura da MQ (* indica os centros quirais).	42
Figura 11. Carboximefloquina - principal metabólito da MQ.	43
Figura 12. Estruturas do <i>n</i> -desmetildiazepam (esquerda) e mirtazapina (direita), utilizados como padrões internos (* indica o centro quiral).	49
Figura 13. Espectros de absorção na região ultravioleta da MQ e CMQ (soluções preparadas em metanol na concentração de 50 µg mL ⁻¹).	65
Figura 14. Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol (95:5, v/v), vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 222 nm.	68
Figura 15. Cromatogramas referentes à resolução dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol/TFA (98:2:0,05, v/v), vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 222 nm.	69
Figura 16. Cromatogramas referentes à resolução dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralcel OD-H. Condições: fase móvel: hexano/etanol/TFA (95:5:0,05, v/v), vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 222 nm.	70
Figura 17. Cromatograma referente à resolução dos enantiômeros da MQ (1 e 2) e CMQ (3) na coluna Chiralcel OD-H. Condições: fase móvel: hexano/etanol/DEA/TFA (95:5:0,1:0,05, v/v), vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 285 nm.	71

Figura 18. Ilustração do processo de extração utilizando-se aminas quaternárias como reagentes catiônicos.....	73
Figura 19. Seleção do solvente orgânico – LPME simultânea MQ e CMQ.....	74
Figura 20. Cromatogramas referentes a um branco de plasma (A) e plasma fortificado com 250 ng mL ⁻¹ de (+)-(RS)-MQ (1) e (-)-(SR)-MQ (2); 500 ng mL ⁻¹ de CMQ (3) e 250 ng mL ⁻¹ de <i>n</i> -desmetildiazepam (PI) (4). Condições de extração: tempo (30 minutos); velocidade de agitação (700 rpm); fase orgânica: tolueno:octanol (9:1); difosfato de tetrabutilamônio 0,5 mol L ⁻¹ (100 µL); NaOH 2 mol L ⁻¹ (50 µL). Condições de análise: coluna Chiralcel OD-H; fase móvel: hexano/etanol/DEA/TFA (95:5:0,1:0,05, v/v); vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 285 nm.....	75
Figura 21. Cromatograma referente à resolução dos enantiômeros da MQ (1 e 4) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min ⁻¹ , λ: 222 nm. Os picos 2 e 3 referem-se aos enantiômeros da mirtazapina (padrão interno).....	77
Figura 22. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: tempo de extração (30 minutos); velocidade de agitação (870 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L ⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.....	79
Figura 23. Avaliação da influência do tempo de extração. Condições de extração: fase orgânica (éter diexílico); velocidade de agitação (870 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L ⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.....	80
Figura 24. Avaliação da influência da velocidade de agitação. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); fase aceptora (HCl 0,1 mol L ⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.....	82
Figura 25. Avaliação da influência do pH da fase doadora. Condições de extração: Tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L ⁻¹); concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); tampões utilizados: fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 6,0); borato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 10,0); fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 12,0). Para pH 13, adicionou-se 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ . Análises em triplicata.....	83
Figura 26. Seleção da concentração de hidróxido de sódio. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L ⁻¹); volume de solução de NaOH (100 µL); concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.	84
Figura 27. Seleção da fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.	85
Figura 28. Influência da adição de etanol na fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L ⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L ⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL ⁻¹); análises em triplicata.	86

Figura 29. Influência da adição de sais na fase doadora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata. 87

Figura 30. Influência da adição de metanol na fase doadora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata. 89

Figura 31. Cromatogramas referentes a um branco de plasma (A) e plasma fortificado (B) com 500 ng mL⁻¹ de (-)-(SR)-MQ (1) e (+)-(RS)-MQ (4) e 375 ng mL⁻¹ de (+)-(S)-MT (2) e (-)-(R)-MT (3) (padrão interno). Condições de extração: conforme a Tabela 6. Condições de análise: coluna Chiralpak AD, fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ: 222 nm..... 90

Figura 32. Regressão linear das curvas analíticas obtidas para os enantiômeros da MQ no intervalo de concentração plasmática de 50 a 1500 ng mL⁻¹, segundo o método proposto..... 93

Figura 33. Teste de racemização das amostras após extração por LPME. Cromatogramas referentes a um plasma fortificado com (-)-(SR)-MQ (A) e (+)-(RS)-MQ (B), segundo a metodologia desenvolvida. Condições de análise: coluna Chiralpak AD, fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ: 222 nm. 100

Figura 34. Cromatogramas referentes a um branco de plasma de rato (A) e amostra de plasma de rato (B) coletado 12 horas após dose oral única de mefloquina (50 mg/kg), processados segundo a metodologia desenvolvida. Picos: (1)(-)-(SR)-MQ; (2)(+)-(S)-MT; (3)(-)-(R)-MT; (4)(+)-(RS)-MQ..... 102

Figura 35. Gráfico da concentração plasmática (média ± D. P.) *versus* tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos, após dose oral única de mefloquina (50 mg/kg; n = 3)..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Impacto da quiralidade na atividade terapêutica ou tóxica de fármacos (adaptado de WILLIAMS; WAINER, 2002).....	21
Tabela 2. Fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente (Adaptado de ABOUL-ENEIN, 1998).	25
Tabela 3. Classificação dos processos de separação baseados em membranas (Adaptado de VAN DER MERBEL, 1999).	31
Tabela 4. Colunas cromatográficas e fases móveis utilizadas no modo polar orgânico.	67
Tabela 5. Colunas cromatográficas e fases móveis utilizadas no modo normal.	68
Tabela 6. Procedimentos otimizados para microextração em fase líquida - três fases.	89
Tabela 7. Recuperação média dos enantiômeros da MQ em plasma pelo método proposto (valores em porcentagem).....	94
Tabela 8. Precisão, exatidão e limite de quantificação do método proposto para análise dos enantiômeros da MQ em plasma.....	97
Tabela 9. Estabilidade dos enantiômeros da MQ em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e após estocagem à temperatura ambiente.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	α_1 -glicoproteína ácida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈	grupo octadecil
CE	eletroforese capilar
CMQ	carboximefloquina
CN	grupo ciano
CV	coeficiente de variação
DEA	dietilamina
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLEC	(-)-1-(9-fluorenil)-etilclorofornato
HF-LPME	microextração em fase líquida com fibras ocas
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LLE	extração líquido-líquido
log <i>P</i>	coeficiente de partição óleo/água
LPME	microextração em fase líquida
LQ	limite de quantificação
MMLLE	extração líquido-líquido em membrana microporosa
MQ	mefloquina
MT	mirtazapina
MTBE	metil- <i>terc</i> -butil-éter
m/v	massa/volume
NEIC	(+)-1-(1-naftil)-etilisocianato
OCT	<i>n</i> -octanol
p. a.	pró-análise
PDMS	polidimetilsiloxano
PI	padrão interno
p <i>K</i> _a	- log da constante de ionização de um ácido
PTFE	politetrafluoretileno

<i>rac</i> -mefloquina	mefloquina racêmica
RSD	desvio padrão relativo
<i>s</i>	estimativa do desvio padrão
SBSE	extração sortiva em barras de agitação
SDME	microextração em gota única
SLM	extração líquida suportada por membranas
SPE	extração em fase sólida
SPME	microextração em fase sólida
TFA	ácido trifluoroacético
TOL	tolueno
$t_{\max}$	tempo necessário para atingir a concentração máxima
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	FÁRMACOS QUIRAIS.....	20
1.2	MÉTODOS ANALÍTICOS ENANTIOSSELETIVOS	23
1.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência empregando fases estacionárias quirais.....	24
1.3	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE ORIGEM BIOLÓGICA.....	26
1.3.1	Extração líquido-líquido convencional.....	27
1.3.2	Extração em fase sólida.....	28
1.3.3	Microextração em fase sólida	28
1.3.4	Extração utilizando membranas.....	29
1.3.4.1	<i>Extração líquido-líquido com membranas em sistemas de fluxo ..</i>	<i>32</i>
1.3.4.2	<i>Microextração em fase líquida com fibras ocas</i>	<i>35</i>
1.4	PROPRIEDADES ESTEREOSSELETIVAS DA MEFLOQUINA	40
1.5	ANALISE ENANTIOSSELETIVA DA MEFLOQUINA.....	44
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1	MATERIAIS.....	48
3.1.1	Reagentes e solventes	48
3.1.2	Soluções-padrão	49
3.1.3	Amostras de plasma	50
3.1.4	Animais	50
3.2	EQUIPAMENTOS	50
3.2.1	Sistema cromatográfico	50
3.2.2	Equipamentos e materiais utilizados em LPME	51
3.2.3	Outros equipamentos.....	51
3.2.4	Colunas cromatográficas quirais e de guarda.....	52

3.3	MÉTODOS	53
3.3.1	Avaliação das colunas cromatográficas quirais	53
3.3.2	Ordem de eluição dos enantiômeros da MQ.....	54
3.3.3	Procedimento de preparação das amostras – LPME.....	54
3.3.3.1	Microextração em fase líquida por par iônico – MQ e CMQ	54
3.3.3.2	Microextração em fase líquida da MQ – três fases.....	55
3.3.4	Validação do método desenvolvido	57
3.3.4.1	<i>Linearidade</i>	57
3.3.4.2	<i>Recuperação</i>	58
3.3.4.3	<i>Limite de quantificação</i>	59
3.3.4.4	<i>Precisão e exatidão</i>	59
3.3.4.5	<i>Estudo de estabilidade</i>	61
3.3.4.6	<i>Teste de racemização</i>	62
3.3.5	Aplicação do método	63
3.3.5.1	<i>Protocolo experimental em ratos</i>	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	DETERMINAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO UV	65
4.2	AVALIAÇÃO DAS COLUNAS QUIRAIS	66
4.2.1	Derivados de celulose e amilose em condições de fase polar orgânica.....	66
4.2.2	Derivados de celulose e amilose em condições de fase normal.....	67
4.3	MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA POR PAR-IÔNICO – MQ E CMQ.....	71
4.3.1	Tipo de reagente iônico	72
4.3.2	Seleção do solvente orgânico	73
4.4	MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DA MEFLOQUINA – TRÊS FASES	76
4.4.1	Fibra cilíndrica hidrofóbica	78

4.4.2	Seleção do solvente orgânico	78
4.4.3	Tempo de extração	79
4.4.4	Velocidade de agitação.....	81
4.4.5	Avaliação do pH da amostra	82
4.4.6	Seleção da fase aceptora	84
4.4.7	Adição de etanol na fase aceptora.....	85
4.4.8	Adição de sais na fase doadora	86
4.4.9	Adição de metanol na fase doadora	88
4.4.10	Procedimento de microextração em fase líquida otimizado	89
4.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	90
4.5.1	Linearidade	91
4.5.2	Recuperação.....	93
4.5.3	Limite de quantificação	94
4.5.4	Precisão e exatidão	95
4.5.5	Estudo de estabilidade.....	97
4.5.6	Teste de racemização.....	99
4.5.7	Seletividade	101
4.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	101
4.7	AVALIAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	104
5	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
	ANEXO A.....	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 FÁRMACOS QUIRAIS

Substâncias com a mesma estrutura contendo um ou mais centros quirais, uma a imagem especular da outra, que não se sobrepõem, são denominados enantiômeros, tendo propriedades físicas e químicas idênticas, diferindo apenas no desvio do plano da luz polarizada ou em reações/interações com outras substâncias quirais (ROMERO, 1998).

Em 1858, Pasteur obteve a separação inicial de um composto racêmico através da coleta manual de cristais enantioméricos de tartarato de amônio sódico. Com os enantiômeros separados, observou que o dextrógiro sofria decomposição mais rápida pelo fungo *Penicillium glaucum*, constituindo o primeiro relato do impacto da quiralidade nas ciências biológicas. Em relação à farmacologia, os efeitos diferenciais de (-)- e (+)-epinefrina sobre a pressão arterial foram descritos no início do século passado (WILLIAMS; WAINER, 2002). Logo, inúmeros outros exemplos de efeitos farmacológicos e toxicológicos estereosseletivos de fármacos quirais também foram demonstrados (Tabela 1).

Essas diferenças estereosseletivas são explicadas devido à natureza quiral de aminoácidos (com exceção da glicina), açúcares, proteínas e ácidos nucleicos, tornando os sítios de ligação fármaco-receptor assimétricos (KUBINYI, 2002). Os sistemas biológicos são particularmente exigentes em relação aos enantiômeros, fato este de suma importância na compreensão dos eventos bioquímicos. A atividade biológica é, em grande parte, um fenômeno de natureza espacial, pois o complexo fármaco-receptor exige, para se formar,

Tabela 1. Impacto da quiralidade na atividade terapêutica ou tóxica de fármacos (adaptado de WILLIAMS; WAINER, 2002).

<i>Fármaco</i>	<i>Efeitos clínicos</i>	
	<i>Enantiômero (S)-</i>	<i>Enantiômero (R)-</i>
Talidomida	Teratogênico	Sedativo
Cetamina	Anestésico	Alucinógeno
Etambutol	Tuberculostático	Promotor de cegueira
1-cloro-2,3-propanediol	Contraceptivo	Toxicante
Estrona	Hormônio sexual	Inativo
Penicilamina	Antiartrítico	Mutagênico
DOPA	Antiparkinsoniano	Sérios efeitos adversos
Propranolol	β -bloqueador	Inativo
Ácido 2-propil-4-pentenóico	Teratogênico	Anticonvulsivante

uma organização espacial específica e adequada, tanto do centro ativo como do substrato. Um dos modelos aceitos para explicar tal fenômeno é denominado de “teoria dos três pontos” (Figura 1), em que a interação diferencial ocorre mediante à formação de três ligações fracas entre grupos de átomos do fármaco e os três grupos diferentes ligados ao carbono quiral do receptor. De acordo com o modelo, somente com estas três ligações pode-se diferenciar um isômero do outro (BOOTH; WAHNON; WAINER, 1997).

Figura 1. Processo de interação fármaco-receptor, segundo a “teoria dos três pontos” (Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Em princípio, isômeros podem diferir nas ações biológicas de várias maneiras: a) os enantiômeros podem ser igualmente ativos, não havendo estereosseletividade observada (situação incomum); b) os enantiômeros podem diferir quantitativamente na atividade biológica (em condições extremas, um enantiômero carece totalmente de efeitos sobre o sistema-alvo); c) os enantiômeros podem diferir qualitativamente nas ações, exibindo atividades distintas sobre o mesmo receptor ou diferentes receptores; d) o comportamento dos enantiômeros pode ser diferente quando são consideradas a forma racêmica e as formas isoladas (TRIGGLE, 1997; WILLIAMS; WAINER, 2002).

Devido às interações estereosseletivas, as propriedades farmacocinéticas, como ligação às proteínas e eventos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação também podem diferir de um enantiômero para o outro. Portanto, um racemato pode conter duas substâncias biologicamente distintas, devendo cada constituinte ser analisado e regulamentado separadamente frente às propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas (RENTSCH, 2002; TRIGGLE, 1997).

No passado, a ação diferencial dos enantiômeros de fármacos quirais em enzimas e receptores era negligenciada. No entanto, a partir da constatação de que diferenças isoméricas podem dar origem à diferenças na atividade biológica, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de estereoisômeros isolados passou a ser uma abordagem de importância fundamental para a indústria farmacêutica (BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996). Nesse contexto, originou-se o debate a respeito da troca de fármacos comercializados na forma racêmica por enantiômeros puros ("racemic switch"). Embora em alguns casos, a mudança não ofereça benefícios terapêuticos

claros, o número de fármacos patenteados como enantiômeros puros é crescente nos últimos anos (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Além do mais, autoridades governamentais responsáveis pela regulamentação e controle da produção de medicamentos passaram a exigir estudos químicos, analíticos, farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos dos enantiômeros em separado e na forma racêmica, para aprovação de fármacos quirais para uso clínico (TRIGGLE, 1997).

1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS ENANTIOSSELETIVOS

De Pasteur até os dias atuais, uma etapa crucial para a investigação de efeitos farmacológicos e toxicológicos de enantiômeros de fármacos quirais é a disponibilidade de procedimentos para a resolução destes compostos. Logo, a necessidade de desenvolvimento de métodos eficazes na separação e quantificação de enantiômeros, tanto em formas farmacêuticas quanto em fluidos biológicos, tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa.

Métodos de análise enantiomérica são baseados em técnicas não-cromatográficas, como polarimetria, ressonância magnética nuclear e ensaios enzimáticos. As desvantagens de tais técnicas incluem a necessidade de amostras puras e a separação dos enantiômeros não é obtida. Dentre as técnicas de resolução quiral utilizadas atualmente, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e, recentemente, a eletroforese capilar (CE). Porém, HPLC é a técnica mais empregada para a análise enantiosseletiva de fármacos quirais (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003).

1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência empregando fases estacionárias quirais

A análise enantiosseletiva por HPLC apresenta ampla versatilidade na determinação de fármacos, tendo como vantagem em relação à cromatografia gasosa, a possibilidade de separação de compostos não-voláteis. Os métodos de resolução quiral por HPLC podem ser classificados em diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, emprega-se uma fase estacionária quiral ou uma fase móvel quiral. Nesse caso, ocorre a formação de diastereoisômeros temporários na fase estacionária ou móvel. Nos métodos indiretos, empregam-se fases estacionárias não-quirais e a resolução ocorre pela formação de diastereoisômeros através de reação com um reagente quiral e enantiomericamente puro (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003; HAGINAKA, 2002).

Grande parte das resoluções quirais por HPLC emprega a metodologia direta através do uso de fases estacionárias quirais. Nas últimas duas décadas, o número de fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente aumentou consideravelmente, permitindo a análise da maioria dos racematos existentes. Diferentes tipos de seletores quirais têm sido utilizados na preparação de fases estacionárias quirais, dentre eles: polissacarídeos e derivados, ciclodextrinas e derivados, proteínas, antibióticos macrocíclicos e outros. Os seletores quirais são derivados e incorporados ou imobilizados na superfície de um suporte (geralmente sílica gel), atuando como discriminadores quirais *in situ* durante o processo. Para tanto, deverá apresentar afinidade seletiva para um dos enantiômeros em particular (HAGINAKA, 2002).

As fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos são largamente usadas na resolução e análise de racematos por HPLC (Tabela 2). As colunas baseadas em polissacarídeos são preparadas pela adição de

derivados de celulose ou amilose (acetato, benzoato e carbamato) a uma matriz de sílica gel; as colunas são utilizadas em fase normal, reversa ou ainda, no modo polar-orgânico. Embora o mecanismo de reconhecimento quiral não esteja claro, estudos sugerem que interações através de ligações de hidrogênio, π - π e dipolo induzido entre enantiômeros e a fase estacionária participem do processo (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

Tabela 2. Fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente (Adaptado de ABOUL-ENEIN, 1998).

<i>Polissacarídeo</i>	<i>Derivado</i>	<i>Coluna</i>
Éster de Celulose
$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_3$	<i>Tris-(4-metilbenzoato)</i> <i>Chiralcel OJ</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$	<i>Tribenzoato</i> <i>Chiralcel OB</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{CH}_3$	<i>Triacetato</i> <i>Chiralcel OA</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$	<i>Tricinamato</i> <i>Chiralcel OK</i>
Carbamato de Celulose
$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$	<i>Tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)</i> <i>Chiralcel OD</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$	<i>Trifenilcarbamato</i> <i>Chiralcel OC</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_3$	<i>Tris-(4-metilfenilcarbamato)</i> <i>Chiralcel OG</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{Cl}$	<i>4-clorofenilcarbamato</i> <i>Chiralcel OF</i>
Carbamato de Amilose
$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$	<i>Tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)</i> <i>Chiralpak AD</i>
	$R = \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{NH} \text{---} \text{CH}(\text{CH}_3) \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$	<i>Tris-[(S)-α-metilfenilcarbamato]</i> <i>Chiralpak AS</i>

Já as colunas baseadas em proteínas, preparadas principalmente com albumina bovina, α_1 -glicoproteína ácida e proteína ovomucóide, são usadas com fases móveis aquosas tamponadas, juntamente com modificadores

polares, com o objetivo de reduzir as interações hidrofóbicas (BONATO et al., 2002). As desvantagens das fases protéicas incluem a baixa capacidade, falta de reprodutibilidade da coluna e conhecimento limitado do mecanismo de reconhecimento quiral. Devido à baixa capacidade, são úteis para propósitos analíticos, porém geralmente ineficazes para fins preparativos (HAGINAKA, 2001).

Recentemente, a introdução de fases estacionárias baseadas em antibióticos ofereceu nova alternativa para a resolução de fármacos utilizados na forma racêmica. A estrutura complexa de tais substâncias contendo diferentes centros quirais, sítios doadores e aceptores de elétrons, cavidades, açúcares e outros grupos, pode proporcionar seletividade adicional nas separações (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

1.3 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE ORIGEM BIOLÓGICA

A determinação de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos (sangue total, plasma, urina, líquido, etc.) é dificultada pela alta concentração de proteínas e compostos endógenos na matriz. Proteínas presentes nestas amostras podem ser desnaturadas e adsorvidas no material de recheio da coluna, levando à mudanças no tempo de retenção e diminuição da eficiência da coluna (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003). Portanto, a análise cromatográfica de substâncias presentes em fluidos biológicos, em geral, requer um pré-tratamento da amostra.

Uma das etapas mais críticas na análise de fármacos presentes em matrizes biológicas consiste na extração e isolamento dos analitos de interesse, de modo que seja efetuada sua determinação qualitativa e

quantitativa por intermédio de uma técnica analítica adequada. A extração visa a remoção dos analitos da matriz, enquanto a etapa de limpeza (“clean-up”) objetiva a remoção de interferentes. Na maioria dos métodos clássicos de análise, as duas etapas geralmente são separadas, tornando os procedimentos tediosos, caros e acarretando grande uso de solventes orgânicos (LANÇAS, 2004). Por outro lado, dentre as tendências recentes no preparo de amostras, estão incluídas: miniaturização, automação e uso reduzido de solventes orgânicos (KATAOKA, 2003).

Dentre as propriedades ideais de um método de extração, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, seletividade e alta recuperação do analito de interesse. Atualmente, as técnicas de preparação de amostras mais utilizadas são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Destacam-se também, os avanços obtidos com duas técnicas de extração miniaturizada: a microextração em fase sólida e a extração utilizando membranas (SAITO; JINNO, 2003).

1.3.1 Extração líquido-líquido convencional

Na extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE), o fenômeno de partição da amostra entre duas fases imiscíveis rege o processo de separação. A escolha adequada do solvente e o ajuste do pH são fundamentais para a recuperação do analito de interesse. Apesar da simplicidade e uso de solventes disponíveis comercialmente, apresenta certas desvantagens, como alto consumo de solventes, formação de emulsões, necessidade de etapa de separação de fases e dificuldade de automação, as

quais desencorajam o uso da técnica (QUEIROZ; COLLINS, JARDIM, 2001; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000).

1.3.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE), bastante divulgada atualmente, utiliza sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril e seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos aos utilizados em cromatografia líquida em coluna. A retenção pode envolver interações apolares, polares e iônicas (KATAOKA, 2003). Na técnica, a amostra é percolada através de uma fase sólida, a qual retém o soluto de interesse, sendo então eluído pela passagem de um solvente orgânico. Apesar de requerer menor volume de solventes orgânicos que LLE, a quantidade não é desprezível. A retenção insuficiente de compostos muito polares, seletividade limitada e alto custo do material são consideradas desvantagens da técnica (QUEIROZ; COLLINS, JARDIM, 2001; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000).

1.3.3 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro-Extraction* - SPME), técnica relativamente recente, tem como dispositivo básico um tubo capilar de fibra ótica, de sílica fundida, recoberto com um fino filme de polímero ou de adsorvente (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A afinidade do recobrimento da fibra para um determinado analito é o fator mais importante nesta técnica. Na SPME, as moléculas se deslocam na matriz e penetram no recobrimento da fibra, sendo estabelecido um equilíbrio de partição do analito entre a fibra e o

meio que o envolve. A SPME pode ser utilizada em dois modos: direto, no qual o dispositivo entra em contato com a matriz (amostras líquidas) ou *headspace*, empregado para análise de compostos de média e alta volatilidade, no qual a fibra é exposta ao *headspace* de amostras gasosas, líquidas ou sólidas (Figura 2). No entanto, a fragilidade e o tempo de uso reduzido das fibras utilizadas, problemas de *carry-over* apresentados, além do preço elevado do dispositivo desestimulam a aplicação da técnica (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Figura 2. Principais modos empregados em SPME: extração direta (A) e extração via *headspace* (B).

Atualmente, a microextração em fase sólida encontra-se disponível em outros formatos. Destes, a extração sortiva em barras de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE*) é bastante interessante. Ao invés de fibras (SPME), utiliza barras de agitação recobertas com PDMS. A barra de agitação é introduzida na solução a ser analisada e, decorrido o tempo de extração, a barra é removida da amostra e os analitos são dessorvidos (LANÇAS, 2004).

1.3.4 Extração utilizando membranas

Em termos simples, membranas podem atuar como barreiras seletivas entre duas fases (Figura 3). Nestes processos, a separação é resultado das

diferenças nas taxas de transporte das espécies através da interface, sendo então possível considerar três tipos de transferência de massas através de membranas: ativo, passivo e facilitado. No processo passivo, os compostos atravessam a membrana de acordo com o gradiente presente no meio. Já no transporte facilitado, um carreador presente na membrana facilita a passagem do analito entre as fases e, finalmente, no processo ativo, a transferência de massas é contrária ao gradiente de concentração (CORDERO et al., 2000).

Figura 3. Representação esquemática do transporte através de membranas (Adaptado de CORDERO et al., 2000).

Há um grande número de técnicas baseadas em membranas sugeridas como alternativas aos procedimentos tradicionais (Tabela 3). A diálise e filtração são empregadas para separar os analitos de baixa massa molar dos compostos de alta massa molar presentes na matriz, promovendo eficiente isolamento, porém não havendo discriminação entre moléculas de menor tamanho. Na diálise, a diferença de concentração nos lados da membrana promove a transferência de massa, levando então à diluição dos analitos. A diálise é largamente utilizada para análise protéica em bioquímica, mas pouco empregada no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2003). Já na eletrodiálise, além do gradiente de

concentração, a diferença de potencial elétrico nos lados da membrana também influencia o processo; analitos carregados passam para a fase de carga oposta e os neutros por difusão passiva. Porém, o uso da técnica para análise de amostras complexas é dificultado pelo bloqueio irreversível da membrana por compostos de alta massa molar (ex.: proteínas), diminuindo então a sua permeabilidade (VAN DER MERBEL, 1999).

Tabela 3. Classificação dos processos de separação baseados em membranas (Adaptado de VAN DER MERBEL, 1999).

<i>Técnica</i>	<i>Princípio</i>	<i>Condição necessária</i>
Diálise	Exclusão por tamanho	Diferença de concentração
Eletrodiálise	Exclusão por tamanho e Transporte seletivo de íons	Diferença de potencial
Filtração	Exclusão por tamanho	Diferença de pressão
Extração líquido-líquido com membranas	Diferença no coeficiente de partição (K)	Diferença de concentração

Técnicas de extração líquido-líquido com membranas são versáteis e eficazes. Nestas metodologias, uma membrana atua como uma fase líquida ou sólida (ex.: polímeros) entre duas outras fases, usualmente líquidas. Uma das fases é a amostra a ser processada (fase doadora) e, no outro lado da membrana, fica a fase aceptora, na qual os analitos extraídos são coletados e transferidos para o instrumento analítico. Este arranjo conserva a versatilidade da LLE, promovendo excelente isolamento e enriquecimento, com uso insignificante de solventes orgânicos (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

A característica mais importante da extração líquido-líquido com membranas é o alto grau de seletividade, onde extratos limpos são obtidos, além da possibilidade de concentração do analito. Com isso, pode-se realizar a

análise de substâncias em níveis de traços pela remoção de interferentes e aumento da concentração do analito à níveis mensuráveis. Outra propriedade importante da técnica é o reduzido consumo de solventes orgânicos aliada à possibilidade do uso *online* aos instrumentos analíticos (JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999). Logo, técnicas de extração líquido-líquido com membranas passaram a ser empregadas em vários formatos, incluindo sistemas de fluxo e microextração em fase líquida com fibras ocas (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2003).

1.3.4.1 Extração líquido-líquido com membranas em sistemas de fluxo

A extração líquida suportada por membranas (*Supported Liquid Membrane* – SLM) é baseada em um sistema de três fases, sendo que a fase orgânica está entre duas fases aquosas. A fase orgânica é imobilizada em uma membrana hidrofóbica porosa, a qual forma uma barreira entre as fases aquosas. Solventes típicos usados incluem hidrocarbonetos de cadeia longa, como *n*-undecano e querosene, ou ainda mais polares, como éter diexílico e fosfato de dioctila. Pode ser considerada como uma extração líquido-líquido envolvendo duas etapas e um processo de diálise (JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999).

De acordo com o princípio da SLM, moléculas neutras (ou não-protonadas) devem ser formadas na fase doadora (ou na interface membrana-fase doadora). Estas moléculas devem ser transportadas através da membrana e, ao serem transformadas em moléculas protonadas (por exemplo, por alteração do pH), são extraídas pela fase aceptora. Há vários parâmetros que

governam o processo de extração sendo o mais importante o pH do meio. Além do mais, pode-se afetar o processo pela adição de pares iônicos ou agentes quelantes na fase doadora, moléculas transportadoras na membrana porosa ou ainda, anticorpos solúveis na fase aceptora (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000).

Para extração de compostos de caráter básico, por exemplo, aminas, deve-se ajustar o pH de tal forma que a maior parte das moléculas esteja na forma não-ionizada e, portanto, passíveis de extração pela membrana orgânica. O canal acceptor do outro lado da membrana é preenchido com solução tamponada ácida. Logo, as moléculas da amina ficarão na forma ionizada, não podendo retornar à membrana. O resultado final é o transporte de moléculas da fase doadora para a aceptora. Após a extração, a fase aceptora é transferida para o instrumento analítico, por exemplo, HPLC em fase reversa. O processo de extração pode ser visto na Figura 4:

Figura 4. Esquema do processo de extração líquida suportada por membranas para compostos de caráter básico (B), ácido (A) e neutros (N) (Adaptado de JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999).

Os compostos de caráter ácido ou permanentemente carregados serão excluídos da membrana orgânica e os compostos neutros estarão nas três fases, porém não serão concentrados. A taxa de extração de macromoléculas neutras será baixa, devido ao baixo coeficiente de difusão promovido pelo uso

de membranas com poros na ordem de $0,2\ \mu\text{m}$ (JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999; TROCEWICZ, 2004).

O principal parâmetro observado na técnica é a eficiência da extração (fração de moléculas do analito recuperadas na fase aceptora), sendo influenciada por vários fatores, incluindo a magnitude do coeficiente de partição (K) do analito entre as fases orgânica e aquosa, fluxo da fase doadora e características e dimensões da membrana e poros (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000).

Outra técnica de extração por membranas, denominada extração líquido-líquido em membrana microporosa (*Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction* - MMLLE) possui o mesmo princípio da LLE, porém é realizada em um sistema de fluxo, o qual facilita a automação e interfaciamento com instrumentos analíticos. Nesta técnica, a fase aceptora é um solvente orgânico, o qual também preenche os poros da membrana, formando então um sistema de duas fases (Figura 5). Membranas porosas de politetrafluoretileno (PTFE) são bastante empregadas. Os solventes mais utilizados são hidrocarbonetos de cadeia longa, como *n*-undecano e querosene, puros ou contendo aditivos (JÖNSSON; MATHIASSEN, 1999; CORDERO et al., 2000).

Figura 5. Esquema do processo de extração líquido-líquido em membrana microporosa (Adaptado de JÖNSSON & MATHIASSEN, 1999).

Assim como na LLE convencional, a eficiência da extração é limitada pelo coeficiente de partição (K) do analito. Logo, a MMLLE é mais adequada para compostos altamente hidrofóbicos, os quais encontrariam dificuldades de serem extraídos em uma fase aceptora aquosa.

Desvantagens em potencial das técnicas mencionadas anteriormente (SLM e MMLLE) incluem a estabilidade da membrana e problemas de *carry-over* (efeitos de memória), por serem utilizadas em várias extrações, além da necessidade de unidades de extração e sistemas de fluxo (bombas peristálticas ou pneumáticas) para extrações eficazes (VAN DER MERBEL, 1999; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000).

1.3.4.2 Microextração em fase líquida com fibras ocas

Jeannot e Cantwell (1996) introduziram o conceito de microextração em gota única (*Single Drop Microextraction – SDME*), a partir do desenvolvimento de uma técnica em que uma micro gota de solvente orgânico imiscível em água (~50 μL) era acomodada na porção final de um dispositivo de PTFE, sendo então imerso na solução contendo a amostra. Após a extração sob agitação, o dispositivo é retirado da amostra e a fase orgânica injetada no cromatógrafo à gás. Posteriormente, a técnica foi modificada, passando-se a utilizar uma microseringa como suporte (Figura 6), onde a fase orgânica era suspensa na ponta da agulha. Tal sistema também possibilita o uso de três fases, onde microlitros de fase aquosa estão contidos no interior da gota de solvente orgânico (JEANNOT; CANTWELL, 1997).

Figura 6. Representação esquemática da SDME (Adaptado de JEANNOT; CANTWELL, 1997).

Nesta técnica, analitos de elevado coeficiente de partição podem obter alta concentração, por serem transferidos por difusão de um grande volume de amostra (1-5 mL) para um microextrato (5-50 μL). No entanto, a microextração em gota única não é tão robusta, ocorrendo perda de solvente durante a extração, especialmente quando é aplicada agitação para acelerar o processo de extração, além da necessidade de pré-tratamento de amostras bastante viscosas ou contendo material particulado (possibilidade de colisão com a microgota)(PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Desse modo, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) idealizaram uma nova metodologia combinando o conceito de extrações com membranas (SLM e MMLLE) com o uso reduzido de razões solvente orgânico/fase aquosa, visto na SDME. Nesta técnica (Microextração em Fase Líquida com fibras ocas, *Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction – HF-LPME*, ou simplesmente, LPME), considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes, uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (Figura 7) é impregnada com solvente orgânico nos poros e contém microlitros de fase aceptora no lúmen (microextrato). Com isso, o microextrato não entra em contato direto com a amostra, podendo-se aplicar agitação sem prejuízo da fase aceptora.

Além do mais, o baixo custo de cada unidade de extração (membrana capilar) possibilita o uso único de cada fibra, evitando-se problemas de *carry-over*, observado nas outras técnicas de extração com membranas (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Figura 7. Membrana capilar de polipropileno utilizada em LPME.

Os fundamentos observados em LPME são similares aos empregados em SLM e MMLLE, porém as técnicas diferem em termos de instrumentação e operação. As técnicas citadas anteriormente operam em sistemas de fluxo (necessidade de bombas), renovando continuamente a membrana com amostra, constituindo então procedimentos instrumentais. Por outro lado, na LPME nenhum aparato específico é necessário para implantação da técnica. Há duas configurações principais em que a LPME é empregada: a) configuração em “U” (Figura 8), utilizando-se duas microseringas conectadas à fibra (mais popular) e b) configuração tipo “haste” (*rod-like*), onde somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJEGAARD, 2004).

Figura 8. Configuração em "U", empregada na LPME.

A LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão (Figura 9). No sistema de duas fases, o analito *A* é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando então para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora) presente no lúmen da fibra. O processo de extração no sistema de duas fases pode ser ilustrado da seguinte maneira:

o equilíbrio é caracterizado pela razão de distribuição $K_{\text{org/a}}$, a qual é definida como a razão da concentração do analito *A* na fase orgânica e na fase doadora no equilíbrio de extração.

Para obtenção de resultados favoráveis neste modo de extração, o analito deverá ser moderadamente ou altamente hidrofóbico contendo grupos

ionizáveis (ácido ou básico) ou ainda, ser um composto neutro e hidrofóbico (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Figura 9. Modos de extração utilizados em LPME (Adaptado de PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

No modo de três fases, o analito *A* é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando então para uma solução aquosa (fase aceptora) presente no lúmen da fibra. A fase orgânica então atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora, impedindo a mistura das duas fases. Resumindo-se, o processo de extração no sistema de três fases pode ser ilustrado da seguinte maneira:

o equilíbrio é caracterizado pela razão de distribuição $K_{org/d}$ e $K_{a/org}$, a qual é definida como a razão de distribuição no equilíbrio entre as fases orgânica (*org*) e doadora (*d*) e fases aceptora (*a*) e orgânica (*org*), respectivamente. A razão

de distribuição total entre as fases aceptora e doadora pode ser enunciada no seguinte modo:

$$K_{a/d} = K_{org/d} \cdot K_{a/org}$$

Para analitos altamente hidrofílicos, que encontrariam dificuldades em serem extraídos na membrana orgânica apenas pelo processo de difusão, outra possibilidade seria a adição de reagente iônico relativamente hidrofóbico à fase doadora, permitindo a formação de par-iônico com o analito de interesse, ocorrendo então a extração (HO et al., 2003).

1.4 PROPRIEDADES ESTEREOSSELETIVAS DA MEFLOQUINA

A malária é provocada por protozoários parasitas da ordem *Apicomplexa* e gênero *Plasmodium* que fazem parte do grupo dos *Coccídeos*, com ciclos complexos de multiplicação sexuada e assexuada. As quatro espécies de plasmódios que infectam o homem (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) são transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*. Aproximadamente todas as mortes decorrentes de malária são ocasionadas pela infecção por *P. falciparum* (GUERIN et al., 2002). Calcula-se que, em todo o mundo, cerca de 500 milhões de pessoas se encontrem em risco constante de sofrer a forma aguda da doença, sendo que estimativas indicam um a três milhões de mortes anuais, principalmente entre crianças africanas, constituindo um sério problema de saúde pública em muitas regiões do planeta (SACHS; MALANEY, 2002). No Brasil, a malária estende-se a praticamente toda a Amazônia, com níveis de endemicidade baixa ou média, porém com alguns

focos de incidência elevada. A situação se caracteriza ainda por alta instabilidade e permanente ameaça em função de variáveis climáticas, demográficas e socioeconômicas (SILVA; OLIVEIRA, 2002; CRAVO; ROSÁRIO, 2002).

Dentre as formas de combate à doença estão incluídos: uso de fármacos antimaláricos (profilaxia ou tratamento), medidas direcionadas ao vetor (inseticidas) e desenvolvimento de vacinas. Atualmente, a utilização de fármacos antimaláricos representa a solução mais eficaz no controle da doença. No entanto, no decorrer das últimas décadas, o aparecimento e a propagação de parasitas resistentes à grande parte dos antimaláricos disponíveis tem-se revelado o principal obstáculo a uma eficiente contenção da malária. Com relação às outras opções, dificuldades de ordem logística, científica e financeira prejudicam o desenvolvimento de vacinas e levam ao aparecimento de resistência aos inseticidas (CRAVO; ROSÁRIO, 2002).

A mefloquina (MQ), composto derivado da quinina, foi sintetizada nos anos setenta pelo *Walter Reed Institute* (EUA) no intuito de combater a resistência de cepas de *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos existentes na época. Foi liberada comercialmente em 1984, sob o nome Lariam[®]. É recomendada para uso isolado e exclusivo na profilaxia e tratamento das infecções causadas pelo *P. falciparum* resistente à cloroquina. Por apresentar reações locais severas no uso de formulações parenterais, o fármaco é disponível apenas para administração oral (HARDMAN; LIMBIRD, 1996; PALMER; HOLLIDAY; BROGDEN, 1993).

A MQ é um esquizontocida sanguíneo altamente eficaz, especialmente contra trofozoítos maduros e formas esquizontes do parasita. O fármaco não

apresenta efeitos contra os estágios hepáticos iniciais e gametócitos maduros de *P. falciparum* ou formas teciduais latentes de *P. vivax*. Apesar de apresentar atividade esporontocida, não é utilizada para esse propósito (HARDMAN; LIMBIRD, 1996). O mecanismo de ação sugerido é a formação de compostos tóxicos com o heme livre, promovendo lesão de membrana e interação com outros componentes do parasita (PALMER; HOLLIDAY; BROGDEN, 1993).

A MQ é um composto quiral (possui dois centros assimétricos), comercializada na forma racêmica da *eritro-α*-(2-piperidil)-2,8-bi(trifluorometil)4-quinolinametanol (Figura 10). Com relação à atividade antimalárica, há controvérsias quanto à diferenças de atividades dos enantiômeros, apesar da (+)-MQ ter apresentado maior eficácia contra algumas cepas de *P. falciparum* em estudos *in vitro*. Sugere-se que tal resultado seja devido à interação seletiva com glicoproteínas P plasmodiais, possibilitando um sistema de transporte ativo em favor de um enantiômero (PETERS et al., 1995; BROCKS; MEHVAR, 2003). Segundo Karle et al. (1993), a presença de anel aromático na estrutura dos antimaláricos é importante para a diferença de atividade dos enantiômeros.

Figura 10. Estrutura da MQ (* indica os centros quirais).

O fármaco apresenta ampla distribuição, sendo altamente ligado à proteínas plasmáticas (~98%). A MQ possui lenta meia-vida de eliminação

(aproximadamente 20 dias). Nos seres humanos, a excreção é principalmente fecal; somente pequenas quantidades são eliminadas na urina (KARBWANG; WHITE, 1990). De acordo com Hellgren et al. (1997), (-)-MQ sofre recirculação entero-hepática. Em voluntários sadios ocidentais e orientais, em todos os parâmetros farmacocinéticos observados (com exceção de t_{max}), os valores de (-)-MQ foram maiores que os do antípoda (MARTIN et al., 1994; GIMENEZ et al., 1994). Tais resultados foram corroborados por estudos em crianças e pacientes sob tratamento crônico (BOURAHILA et al., 1996; HELLGREN et al., 1997). No entanto, resultados contrários foram observados em ratos, obtendo-se valores mais elevados para (+)-MQ, indicando cinética estereosseletiva diferencial entre as espécies (BAUDRY et al., 1997).

O fármaco sofre metabolização hepática pelo complexo enzimático citocromo P450 3A, resultando na formação de metabólitos hidroxilados e carboxilados. O principal metabólito da mefloquina é a carboximefloquina (CMQ), que diferentemente do composto original, não apresenta centros quirais (Figura 11). Estudos *in vitro* demonstraram ausência de atividade antimalárica da CMQ, porém a determinação plasmática do metabólito é importante para o acompanhamento da terapêutica (HÅKANSON; LANDBERG-LINDGREN; BJÖRKMAN, 1990; BANCHANG; KARBWANG; BACK, 1992; BASCO et al., 1991).

Figura 11. Carboximefloquina - principal metabólito da MQ.

Embora pouco estudados, os eventos adversos decorrentes da profilaxia e terapêutica com MQ podem ser enantiosseletivos. Dentre as reações atribuídas ao uso do fármaco, destacam-se os efeitos neuropsiquiátricos. Pham et al. (1999) verificaram maiores concentrações cerebrais de (-)-MQ em análise *postmortem* de pacientes vitimados por malária cerebral. A penetração dos enantiômeros da MQ no cérebro de ratos também foi estereosseletiva na mesma maneira vista em humanos. Por outro lado, não foi observada a presença do metabólito CMQ no tecido cerebral (BAUDRY et al., 1997). A interação estereosseletiva dos enantiômeros da MQ com a glicoproteína-P (proteína transportadora de membranas celulares), presente na barreira hematoencefálica, pode explicar tal comportamento (PHAM et al., 2000).

1.5 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA MEFLOQUINA

O primeiro método desenvolvido para análise da MQ foi de Grindel, Tilton e Shaffer (1977), permitindo a quantificação do fármaco no sangue total, plasma e urina por HPLC, após o composto ter sido extraído com acetato de etila. Mais tarde, Bergqvist, Hellgren e Churchill (1988) idealizaram um método de análise simultânea da MQ e CMQ no plasma e sangue total por HPLC, empregando sulfato de zinco-acetonitrila na desproteinização das amostras e metil-*terc*-butil-éter para extração líquido-líquido. Já Green et al. (1999) obtiveram a análise do fármaco e do metabólito em plasma utilizando-se de extração em fase sólida e HPLC em fase reversa.

A análise enantiosseletiva da MQ teve início com Gimenez et al. (1990), com o desenvolvimento de um método de análise em plasma e sangue total,

utilizando um sistema em duas etapas independentes: fase estacionária aquiral (coluna cianopropil) para a quantificação da *rac*-MQ e fase estacionária quiral (*s*-naftiluréia) para determinação da razão enantiomérica, sendo observado limite de quantificação de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando $500 \mu\text{L}$ de plasma. O método foi modificado mais tarde (GIMENEZ et al., 1993), passando a operar apenas com um detector. No entanto, este sistema é bastante complicado e o tempo de análise é longo (40 minutos).

Qiu, Kitamura e Guillory (1992) propuseram um método para quantificação dos quatro isômeros do fármaco, (+) e (-)-*eritro* e (+) e (-)-*treo*, em formas farmacêuticas, utilizando fase estacionária quiral (coluna Chiralpak AD - amilose-*tris*-3,5-dimetilfenilcarbamato) e hexano-etanol-dietilamina (96:4:0,1 v/v%) como fase móvel. Porém, esse método aplica-se apenas ao controle de qualidade de medicamentos.

Bergqvist et al. (1993) usaram uma coluna tendo o seletor quiral *n*-benzoilcarbonil-glicil-*L*-prolina, em fase reversa, aplicando-a em um método enantiosseletivo para análise da MQ em plasma, porém a coluna utilizada apresentava instabilidade no uso rotineiro. Outro método analítico foi desenvolvido por Wallén et al. (1994), usando a coluna chiral AGP e fase móvel constituída por 10% de *n*-propanol em solução-tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,85 e operando o detector UV em 222 nm.

Com relação aos métodos indiretos de separação quiral em HPLC, Bergqvist, Doverskog e Al-Kabbani (1994) apresentaram um método tendo como reagente quiral (-)-1-(9-fluorenil)-etilcloroformato (FLEC), com posterior separação dos diastereoisômeros em coluna aquiral C_{18} e fase móvel acetonitrila-água-ácido acético (82:18:0,07, v/v/v). Mais recentemente, Souri,

Farsam e Jamali (1997), realizaram derivatização com (+)-NEIC, ocorrendo a separação diastereoisomérica em fase estacionária aquiral (sílica) e fase móvel hexano-clorofórmio-metanol (74:25:0,1 v/v/v), com detecção UV em 282 nm. Este mesmo grupo (SOURI; FARSAM; ZARE, 2003), desenvolveu metodologia de análise para determinação dos enantiômeros em sangue total, a partir de extração líquido-líquido (MTBE), com posterior derivatização com (+)-(FLEC) e análise em coluna tradicional de fase reversa.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de LPME para a análise enantiosseletiva da MQ em plasma, visando a aplicação do método em um estudo piloto de disposição cinética em ratos. Com isso, foram propostas as seguintes etapas:

- a) Desenvolver um método para a análise enantiosseletiva da MQ em plasma empregando a LPME como técnica de preparação das amostras;
- b) Validar o método de resolução e quantificação dos enantiômeros do fármaco;
- c) Aplicar esta nova metodologia em um estudo piloto de disposição cinética em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 *Reagentes e solventes*

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (hexano, metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila) foram grau cromatográfico, obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e EM Science (Gibbstown, EUA). A dietilamina e ácido trifluoroacético, empregados como aditivos na fase móvel, foram obtidos da Fluka (Buchs, Suíça).

Os reagentes empregados no preparo das soluções-tampão utilizadas no tratamento das amostras (fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico dihidratado, fosfato de sódio tribásico, ácido bórico e borato de sódio), além do sal cloreto de sódio, foram grau p.a., obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos da Nuclear (São Paulo, Brasil) e Chemco (Campinas, Brasil), respectivamente. O reagente difosfato de tetrabutylamônio, grau cromatográfico, foi obtido da Acros Organics (Geel, Bélgica). A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema MILLI-Q-PLUS® (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

Os solventes utilizados na otimização dos métodos empregando LPME foram tolueno (Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA), éter diexílico (Alfa Aesar – Johnson Matthey Company, Ward Hill, EUA), éter dibutílico e *n*-octanol, ambos provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), todos de grau cromatográfico ou analítico.

3.1.2 Soluções-padrão

A mefloquina racêmica (MQ) e a carboximefloquina (CMQ) utilizadas na preparação das soluções-padrão foram gentilmente cedidas por Novartis (Basel, Suíça). Em primeiro lugar, foram preparadas soluções de MQ e CMQ em metanol grau cromatografia (Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de uso, por diluição em metanol, nas concentrações 5 e $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para uso na avaliação das colunas cromatográficas. Da mesma forma, soluções-padrão nas concentrações de 4, 8, 16, 40, 80 e $120 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero da MQ foram preparadas para os experimentos de validação do método. Para obtenção das amostras-controle, foram preparadas soluções nas concentrações de 12, 48 e $96 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero da MQ. Soluções-padrão de *n*-desmetildiazepam e mirtazapina (MT) racêmica (25 e $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), utilizados como padrões-internos, foram preparadas em metanol (Figura 12). Estes fármacos foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA) e Organon (Oss, Holanda), respectivamente. Todas as soluções foram estocadas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz durante todo o processo.

Figura 12. Estruturas do *n*-desmetildiazepam (esquerda) e mirtazapina (direita), utilizados como padrões internos (* indica o centro quiral).

3.1.3 Amostras de plasma

No desenvolvimento e validação do método, utilizou-se amostras de plasma humano livres de MQ e CMQ, obtidas junto ao Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, armazenadas a -20 °C até o momento da análise. As amostras em uso eram inicialmente descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas durante 10 minutos a 2000 g para a remoção de partículas suspensas. Para aplicação do método, optou-se por realizar experimentos em ratos em vez de voluntários sadios ou pacientes, devido a maior facilidade em aprovação do estudo junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto.

3.1.4 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, pesando aproximadamente 200 g, com idade de 6-8 semanas. Os animais provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto foram adaptados (3 por gaiola) em sala com temperatura (21-23 °C) e umidade (40-60 %) controladas e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração padronizada para a espécie.

3.2 EQUIPAMENTOS

3.2.1 Sistema cromatográfico

Para avaliação das colunas e desenvolvimento do método em HPLC empregou-se o cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), constituído por uma

bomba modelo LC10AS, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 μ L, um detector por absorbância no UV-Vis modelo SPD-A e um integrador Chromatopac modelo C-R6A.

3.2.2 Equipamentos e materiais utilizados em LPME

Durante a etapa de preparação das amostras empregando a LPME, foram utilizados um agitador de tubos AP56 (Phoenix, Araraquara, Brasil) e um agitador magnético obtido da Corning Inc., modelo PC-210 (Corning, EUA). Outros materiais empregados no procedimento em LPME incluíram: frascos âmbar de vidro com capacidade para 4 mL (Supelco, Bellefonte, EUA), membranas capilares de polipropileno, modelo Accurel PP Q 3/2 (600 μ m de diâmetro interno, 200 μ m de espessura da parede e 0,2 μ m de tamanho dos poros, Membrana, Wuppertal, Alemanha), barras de agitação magnética, de dimensões 10 mm x 3 mm (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e microseringas (modelo LC FN – Agilent Technologies, Palo Alto, EUA e modelo 1725 RNR – Hamilton, Reno, EUA), ambas com capacidade para 250 μ L.

3.2.3 Outros equipamentos

Para verificação do comprimento de onda de absorção máxima da MQ e CMQ foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis-NIR, modelo U-3501 (Hitachi, Tokyo, Japão), juntamente com celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Também foi empregado um pHmetro obtido da Corning Inc., modelo 430 (Corning, EUA) para medição do pH das soluções-tampão.

3.2.4 Colunas cromatográficas quirais e de guarda

Para a escolha de uma coluna apropriada e eficiente para a separação da CMQ e dos enantiômeros da MQ, foram avaliadas várias colunas cromatográficas quirais baseadas em derivados de celulose e amilose:

Coluna Chiralpak AS (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, EUA) constituída de um derivado de amilose tris-(S)- α -metilfenilcarbamato recobrindo partículas de sílica de 10 μ m.

Coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, EUA) constituída de um derivado de amilose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μ m.

Coluna Chiralcel OJ-R (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, EUA) constituída de um derivado de celulose tris-(4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 5 μ m.

Coluna Chiralcel OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, EUA) constituída de um derivado de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de 5 μ m.

As colunas Chiralpak AS e Chiralcel OJ-R, baseadas em derivados de amilose e celulose, respectivamente, foram utilizadas no modo polar orgânico, enquanto que as colunas Chiralpak AD e Chiralcel OD-H, baseadas em derivados de amilose e celulose, respectivamente, foram empregadas em condições de fase normal.

Para análise de amostras de plasma, utilizou-se uma coluna de guarda CN LiChrospher (4 x 4 mm, Merck, Alemanha) constituída de partículas de 5 μ m de diâmetro de sílica modificada com grupos cianopropil.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 *Avaliação das colunas cromatográficas quirais*

Para a eficaz resolução da CMQ e dos enantiômeros da MQ, fez-se necessária a avaliação das colunas cromatográficas expostas acima em dois modos: polar orgânico, utilizando-se solventes orgânicos polares (metanol, etanol e acetonitrila), ou modo normal, com fases móveis compostas por hexano/modificador polar, por vezes adicionadas de dietilamina (DEA) ou ácido trifluoroacético (TFA). As fases móveis empregadas foram preparadas pela simples mistura dos componentes com posterior homogeneização.

Para a avaliação das colunas cromatográficas, 25 μL das soluções-padrão de MQ e CMQ, na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram transferidos para tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL da fase móvel e 50 μL foram cromatografados. A detecção da CMQ e dos enantiômeros da MQ foi feita empregando o detector UV-Vis, em 222 nm. As injeções somente eram realizadas após o condicionamento da coluna com a fase móvel e estabilização da linha de base. No final da avaliação diária, procedeu-se lavagem das colunas operando no modo normal com fase móvel hexano/isopropanol (9:1, v/v), conforme recomendado pelo fabricante. Já para as colunas avaliadas no modo polar-orgânico de eluição, realizou-se lavagem com etanol.

3.3.2 Ordem de eluição dos enantiômeros da MQ

Após estabelecer as condições de separação, a ordem de eluição foi determinada analisando-se 25 μL de soluções dos enantiômeros puros, obtidos por análise semipreparativa, conforme descrito a seguir. Alíquotas de 50 μL de soluções-padrão de *rac*-MQ na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram secas sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de fase móvel e as soluções resultantes foram injetadas no sistema cromatográfico desenvolvido neste trabalho. Após a resolução dos enantiômeros, os mesmos foram coletados separadamente na saída do detector, secos sob fluxo de ar comprimido, dissolvidos e analisados no sistema descrito por Qiu, Kitamura e Guillory (1992).

3.3.3 Procedimento de preparação das amostras – LPME

3.3.3.1 Microextração em fase líquida por par iônico – MQ e CMQ

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando-se 1 mL de plasma livre dos analitos, previamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 g, fortificado com 25 μL de solução-padrão de *rac*-MQ (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e de CMQ (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), além de 25 μL de solução-padrão de *n*-desmetildiazepam (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), usado como padrão interno. Adicionou-se 100 μL de solução aquosa de difosfato de tetrabutílamônio (0,5 mol L^{-1}) para formação dos pares-iônicos e fez-se diluição com água purificada para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma livres dos analitos, bem como alíquotas de água purificada também foram

processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Para cada extração, uma seção de membrana capilar de polipropileno, de 6,5 cm de comprimento e fixada nas extremidades com o auxílio de microseringas era imersa durante 10 segundos no solvente orgânico para sua deposição nos poros da membrana. Em seguida, o excesso de solvente era retirado em banho ultra-sônico durante 15 segundos. Após a impregnação, cerca de 20 μL de fase aceptora (neste caso, um solvente orgânico) era introduzido no interior da membrana capilar, utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar então era imersa na fase doadora (matriz contendo os analitos) e iniciada a extração sob agitação magnética. Após 30 minutos, a fase aceptora era retirada da membrana usando outra microseringa e transferida para um tubo de ensaio âmbar. Finalmente, o extrato era evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, sendo então dissolvido em 80 μL de fase móvel e 50 μL injetados no sistema cromatográfico.

Na avaliação do procedimento de extração empregando LPME por par iônico, os seguintes parâmetros foram observados: tipo de solvente orgânico e tipo de reagente de formação de par iônico.

3.3.3.2 Microextração em fase líquida da MQ – três fases

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando-se 1 mL de plasma livre dos analitos, previamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 g, fortificado com 25 μL de solução-padrão de *rac*-mefloquina (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), além de 25 μL de solução-padrão de MT racêmica (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), usada como padrão interno. Fez-se diluição com

água purificada para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma livres dos analitos, bem como alíquotas de água purificada também foram processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Para cada extração, uma seção de membrana capilar de polipropileno, de 6,5 cm de comprimento e fixada nas extremidades com o auxílio de microseringas era imersa durante 10 segundos no solvente orgânico para sua deposição nos poros da membrana. Após, o excesso de solvente era retirado em banho ultra-sônico durante 15 segundos. Após a impregnação, cerca de 20 µL de fase aceptora (neste caso, uma solução aquosa) era introduzido no interior da membrana capilar, utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar então era imersa na fase doadora (matriz contendo os analitos) e iniciada a extração sob agitação magnética. Após o tempo necessário de extração, a fase aceptora era retirada da membrana usando outra microseringa e transferida para um tubo de ensaio âmbar. Finalmente, o extrato era evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, sendo então dissolvido em 80 µL de fase móvel e 50 µL injetados no sistema cromatográfico.

Na avaliação do procedimento de extração empregando LPME em três fases, os seguintes parâmetros foram observados: tipo de solvente orgânico, tempo de extração, velocidade de agitação, pH da fase doadora, concentração de hidróxido de sódio, tipo de fase aceptora, adição de etanol na fase aceptora, adição de sais e de metanol na fase doadora.

3.3.4 Validação do método desenvolvido

Após a definição do método de extração e análise cromatográfica da MQ, procedeu-se a validação do método desenvolvido para garantia da confiabilidade e segurança dos resultados obtidos.

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos por algumas agências regulamentadoras e recomendações recentes presentes na literatura (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003; Eurachem, 1998; Food and Drug Administration, 2001; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2003; HUBERT et al., 1999; ROSING et al., 2000; SHAH et al., 2000) para análise de fármacos em fluidos biológicos.

3.3.4.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de curvas analíticas de amostras de plasma previamente fortificadas nas concentrações de 50, 100, 200, 500 1000 e 1500 ng de cada enantiômero por mL de plasma e adicionadas de 25 μL de solução-padrão de *rac*-MT ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras fortificadas foram, então, submetidas ao processo de extração e análise cromatográfica.

Como empregou-se o método da padronização interna, as curvas analíticas foram obtidas plotando-se as razões de alturas dos picos (MQ/PI) no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações plasmáticas no eixo das abcissas. Nas condições avaliadas, os enantiômeros da mirtazapina também são separados; o primeiro pico no cromatograma foi utilizado nos cálculos. A

análise estatística dos dados foi obtida pelo método da regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi obtida por intermédio do coeficiente de determinação (r^2), utilizando-se o limite de quantificação como limite inferior (LANÇAS, 2004). Na avaliação da linearidade estabeleceu-se também que os desvios dos valores nominais não poderiam ser superiores a 15%.

3.3.4.2 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra em extrair o analito de interesse presente (BRAGGIO et al., 1996), sendo calculada pela equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração real}} \times 100$$

Na prática, é obtida comparando-se a resposta de amostras fortificadas após o processo de extração em relação a padrões não-extraídos na mesma concentração, os quais representam 100% de recuperação (BRAGGIO et al., 1996). Desta forma, amostras de plasma previamente fortificadas com soluções-padrão de *rac*-MQ nas concentrações de 150, 600 e 1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma foram analisadas pelo método de extração proposto (triplicata para cada concentração). A concentração obtida destas amostras foi calculada empregando-se curvas analíticas construídas com dados resultantes da análise direta de soluções-padrão não submetidas ao

processo de extração, em duplicata para cada concentração. Vale ressaltar que a recuperação foi avaliada adicionando-se o padrão interno (MT) apenas aos extratos obtidos no procedimento de preparação das amostras.

3.3.4.3 Limite de quantificação

Para o método proposto, o limite de quantificação foi determinado fortificando amostras de plasma na concentração de 50 ng mL⁻¹ de cada enantiômero, em quintuplicata. Tais amostras foram adicionadas da solução de padrão interno, submetidas ao procedimento de extração e analisadas utilizando-se de curvas analíticas obtidas de amostras de plasma previamente fortificadas nas concentrações de 50, 100, 200, 500 1000 e 1500 ng de cada enantiômero por mL de plasma e adicionadas de 25 µL de solução-padrão de *rac*-MT (30 µg mL⁻¹), em duplicata para cada concentração.

3.3.4.4 Precisão e exatidão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. Diz respeito aos erros aleatórios que provocam flutuações nos resultados (CHASIN, A.; CHASIN, M.; SALVADORI, 1994). A medida da precisão pode ser expressa através do cálculo da estimativa do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação (ou desvio padrão relativo - RSD), obtidos em condições determinadas (LEITE, 2002):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

A exatidão (em inglês *accuracy*) é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada através da inexatidão ou *bias* (vies ou tendenciosidade), ou seja, o afastamento entre os valores esperado e o obtido (LEITE, 2002). A baixa exatidão é proveniente de erros sistemáticos que contribuem para os desvios ou tendências nos resultados. O cálculo da exatidão é normalmente expresso em função da porcentagem do erro relativo:

$$\text{Exatidão (erro relativo, \%)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100$$

Para a avaliação da precisão e exatidão, foram preparadas amostras de 20 mL de plasma fortificadas nas concentrações de 150, 600 e 1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma. Essas amostras foram divididas em alíquotas de 6 mL, acondicionadas em tubos âmbar, tampados, protegidos da luz e estocados sob refrigeração (-20 °C) até o momento da análise. A precisão e exatidão do método desenvolvido foram avaliadas através de estudos intra e interensaios.

A precisão e exatidão intra-ensaio foi verificada analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 150, 600 e 1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma, em quintuplicata para cada concentração. As concentrações dos enantiômeros nas amostras foram determinadas

empregando uma curva analítica preparada no mesmo dia, conforme descrito no item limite de quantificação.

O estudo da precisão e exatidão interensaios foi realizado analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 150, 600 e 1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma, em quintuplicata para cada concentração, durante três dias consecutivos. Da mesma forma, para cada dia de análise, empregou-se uma nova curva analítica, conforme descrito anteriormente.

3.3.4.5 *Estudo de estabilidade*

Muitos fatores podem afetar a estabilidade dos analitos presentes nas amostras, incluindo propriedades intrínsecas da substância, condições de armazenamento e características da matriz (SHAH et al., 2000). Logo, estudos devem ser efetuados para avaliar a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio das amostras, tempo e condições de análise e ciclos de congelamento e descongelamento. Tais condições de estudo devem refletir as condições verdadeiras possíveis de ocorrência em laboratórios de rotina (SWARTZ; KRULL, 2003). Neste teste, foi avaliada a estabilidade da MQ durante ciclos de congelamento e descongelamento e tempo e condições de análise, utilizando-se do método proposto.

Para verificação da estabilidade da MQ durante ciclos de congelamento e descongelamento, utilizou-se amostras de plasma fortificado nas concentrações baixa (150 ng de cada enantiômero por mL de plasma) e alta (1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma), em triplicata para cada concentração. As amostras foram congeladas a -20 °C por 24 horas e então

submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20 °C por 12 horas. O ciclo de congelamento e descongelamento foi repetido novamente, quantificando-se o fármaco presente nas amostras após o terceiro ciclo. Vale ressaltar que o padrão interno foi adicionado após o término dos ciclos e os resultados (razão das alturas MQ/PI) foram comparados aos obtidos da análise de amostras frescas, utilizando-se do teste *t* de Student, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para a realização do estudo de estabilidade no tempo e condições de análise, utilizou-se amostras de plasma fortificado nas concentrações baixa (150 ng de cada enantiômero por mL de plasma) e alta (1200 ng de cada enantiômero por mL de plasma), em triplicata para cada concentração. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e mantidas durante 12 horas sobre a bancada de trabalho, quantificando-se o fármaco após o término do tempo. Da mesma forma, o padrão interno foi adicionado após o término do tempo e os resultados (razão das alturas MQ/PI) foram comparados aos obtidos da análise de amostras frescas, utilizando-se do teste *t* de Student, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3.4.6 Teste de racemização

Foi avaliada a possibilidade de ocorrer, durante o processo de extração, a racemização dos enantiômeros da MQ. Portanto, alíquotas de 50 µL de soluções-padrão de *rac*-MQ na concentração de 50 µg mL⁻¹ foram secas sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 80 µL de fase móvel

e as soluções resultantes foram injetadas no sistema cromatográfico. Após a resolução dos enantiômeros, os mesmos foram coletados separadamente na saída do detector, secos sob fluxo de ar comprimido e dissolvidos em metanol (300 μ L). A seguir, amostras de 1 mL de plasma foram fortificadas, em triplicata, com 25 μ L da solução de cada enantiômero e submetidas à extração. Conjuntamente foram analisadas soluções de cada enantiômero não submetidas ao processo de extração, para confirmação dos tempos de retenção e comparação com as amostras submetidas ao processo de extração.

3.3.5 Aplicação do método

3.3.5.1 Protocolo experimental em ratos

Os animais foram mantidos em jejum de 12 h, recebendo apenas água e, ao final do período, foi administrado por via oral (gavagem), cloridrato de mefloquina em suspensão aquosa (Tween 80 2%), na dose única de 50 mg/kg. Alimentação foi oferecida aos animais, aproximadamente 1 hora após a administração do fármaco.

As amostras de sangue (6 mL) foram colhidas nos tempos 2, 4, 8, 12, 16, 24, 48 e 56 h após a administração ($n = 3$ para cada tempo de coleta), utilizando-se heparina (Liquemine[®] 25.000 UI) como anticoagulante. Os animais foram induzidos ao plano anestésico em câmara previamente vaporizada com éter etílico e, após a perda dos reflexos, foram posicionados em decúbito dorsal e iniciada abertura da cavidade abdominal para a coleta de sangue a partir da aorta inferior. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 g,

15 min., 4 °C) foram armazenados a -20 °C e sob proteção da luz até o momento da análise.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do trabalho era nosso objetivo desenvolver um método para análise simultânea da CMQ e dos enantiômeros da MQ. Portanto, a determinação dos comprimentos de onda (item 4.1), a fase de avaliação das colunas quirais (item 4.2) e testes de extração com par iônico (item 4.3) foram realizados para o fármaco e o metabólito. Posteriormente, em razão da dificuldade em otimizar as condições de extração simultânea do fármaco e metabólito, passamos a considerar apenas a MQ (item 4.4).

4.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO UV

Para verificação dos comprimentos de onda ideais para detecção no ultravioleta de MQ e CMQ, foram obtidos os espectros de absorção no intervalo de 200 a 400 nm. Observa-se que ambos os analitos apresentaram duas bandas de absorção evidentes, tendo absorção máxima próximo a 222 nm (Figura 13).

Figura 13. Espectros de absorção na região ultravioleta da MQ e CMQ (soluções preparadas em metanol na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2 AVALIAÇÃO DAS COLUNAS QUIRAIS

Foram avaliadas várias colunas com diferentes fases estacionárias quirais para verificar a capacidade de resolução dos enantiômeros da MQ e de CMQ. Na seleção da coluna mais adequada para o método a ser desenvolvido, variou-se apenas a composição da fase móvel, de acordo com a solubilidade e a estrutura dos analitos.

4.2.1 Derivados de celulose e amilose em condições de fase polar orgânica

Nos últimos anos, tem aumentado o emprego da fase polar orgânica na resolução de enantiômeros com fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos, devendo-se principalmente à grande solubilidade dos analitos em tais solventes (metanol, etanol e acetonitrila) em comparação à fases móveis usuais (normal e reversa). Outro ponto a ser observado é a maior facilidade na reciclagem de solventes quando utilizados isoladamente e na remoção do solvente orgânico em aplicações em escala preparativa (MILLER; ORIHUELA; MURPHY, 1999).

As colunas Chiralpak AS e Chiralcel OJ-R, baseadas em derivados de amilose e celulose, respectivamente, foram utilizadas no modo polar orgânico, acompanhado ou não de aditivos (DEA), conforme mostra a Tabela 4. No entanto, nas condições testadas, não foi obtida a resolução dos enantiômeros da MQ.

Tabela 4. Colunas cromatográficas e fases móveis utilizadas no modo polar orgânico.

<i>Coluna cromatográfica quiral</i>	<i>Fase móvel</i>
Chiralpak AS	etanol/DEA (100:0,1, v/v)
	acetonitrila/DEA (100:0,1, v/v)
	acetonitrila/DEA (100:0,3, v/v)
	metanol/DEA (100:0,1, v/v)
	etanol/acetonitrila/DEA (90:10:0,1, v/v)
Chiralcel OJ-R	etanol (100, v)
	etanol/DEA (100:0,1, v/v)
	acetonitrila/DEA (100:0,1, v/v)
	metanol/DEA (100:0,1, v/v)

DEA: dietilamina.

4.2.2 Derivados de celulose e amilose em condições de fase normal

As colunas Chiralpak AD e Chiralcel OD-H, baseadas em derivados de amilose e celulose, respectivamente, foram empregadas em condições de fase normal, utilizando hexano como solvente apolar juntamente com isopropanol ou etanol como modificadores polares (Tabela 5). Também foi verificada a influência da adição de aditivos, tais como TFA e DEA.

Na coluna Chiralpak AD, verificou-se inicialmente o uso de fase móvel isenta de aditivos. Porém, apesar da resolução dos enantiômeros da MQ, não observou-se a eluição do metabólito CMQ (Figura 14). Tal fato deve-se ao caráter ácido deste composto ($pK_a = 4,5$), havendo a necessidade da presença de substâncias ácidas na composição da fase móvel (ex.: TFA), as quais mascaram os grupos silanóis residuais presentes, permitindo a eluição do composto de interesse em tempo adequado e na forma de um pico simétrico (TANG, 1996). Logo, adicionou-se TFA nas análises posteriores.

Tabela 5. Colunas cromatográficas e fases móveis utilizadas no modo normal.

<i>Coluna cromatográfica quiral</i>	<i>Fase móvel</i>
Chiralpak AD	hexano/etanol (95:5, v/v)
	hexano/etanol/TFA (95:5:0,1, v/v)
	hexano/etanol/TFA (95:5:0,2, v/v)
	hexano/etanol/TFA (95:5:0,05, v/v)
	hexano/etanol/TFA (98:2:0,05, v/v)
	hexano/isopropanol/TFA (95:5:0,1, v/v)
	hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v)
Chiralcel OD-H	hexano/isopropanol/TFA (95:5:0,1, v/v)
	hexano/etanol/TFA (95:5:0,1, v/v)
	hexano/etanol/TFA (95:5:0,05, v/v)
	hexano/etanol/TFA/DEA (95:5:0,05:0,025)
	hexano/etanol/TFA/DEA (95:5:0,1:0,025)
	hexano/etanol/TFA/DEA (95:5:0,05:0,05)
	hexano/etanol/TFA/DEA (95:5:0,1:0,05)

DEA: dietilamina; TFA: ácido trifluoroacético.

Figura 14. Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol (95:5, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ: 222 nm.

Outro ponto observado foi o aumento da retenção dos compostos (Figura 15) com a diminuição da quantidade de modificador polar (etanol), comportamento de acordo com o mecanismo de fase normal, onde as moléculas do modificador orgânico competem com as do analito na adsorção

Figura 15. Cromatogramas referentes à resolução dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol/TFA (98:2:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ : 222 nm.

em sítios específicos na fase estacionária (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002; PERSSON; ANDERSSON, 2001).

Apesar de mudanças na composição da fase móvel, verificou-se que a resolução simultânea da CMQ e dos enantiômeros da MQ obtida na coluna Chiralpak AD não era desejável, optando-se então pela coluna Chiralcel OD-H. Utilizou-se então etanol como modificador orgânico, obtendo-se resolução e tempos de retenção satisfatórios para a análise (Figura 16).

Em relação à MQ, notou-se que a fase móvel hexano/etanol/TFA resultou em boa separação dos enantiômeros, além de serem observados picos finos e simétricos. A participação do TFA neste mecanismo deve-se à formação de par iônico com as moléculas de MQ (de caráter básico, $pK_a = 8,5$), além da interação com os grupos silanóis residuais através de ligações de hidrogênio, permitindo a resolução dos enantiômeros (TANG, 1996). Contudo, a presença do aditivo em grandes quantidades na fase móvel aumenta o tempo

Figura 16. Cromatogramas referentes à resolução dos enantiômeros da MQ (A) e CMQ (B) na coluna Chiralcel OD-H. Condições: fase móvel: hexano/etanol/TFA (95:5:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ : 222 nm.

de estabilização da linha de base e diminui a qualidade da análise, logo, diminuiu-se a quantidade deste sem prejuízo na resolução dos enantiômeros, definindo-se então a fase móvel hexano/etanol/TFA (95:5:0,05, v/v).

Infelizmente, o sistema desenvolvido (coluna Chiralcel OD-H e fase móvel hexano/etanol/TFA) apresentou instabilidades como o surgimento de caudas e sobreposição de picos, possivelmente pelo efeito de memória da coluna, visto já ter sido utilizada em outros estudos. Com isso, buscou-se uma alternativa para a separação dos enantiômeros da MQ e o metabólito aquiral CMQ. Apesar de incomum, o uso de ambos aditivos (TFA e DEA) na fase móvel pode ser útil na separação de compostos de caráter diferentes (TANG, 1996; KUMAR et al., 2004). Variando-se a proporção dos aditivos, verificou-se comportamento bastante interessante para a CMQ, onde o aumento da concentração de TFA levou ao aumento no tempo de retenção do analito. A fase móvel que ofereceu melhores resultados foi assim definida:

hexano/etanol/TFA/DEA (95:5:0,1:0,05, v/v). Porém, devido a problemas de instabilidade da linha de base operando-se em comprimentos de onda mais baixos (neste caso, 222 nm) optou-se pela detecção em 285 nm (banda de menor absorção dos analitos) para análise das amostras (Figura 17). Nestas condições, o primeiro pico refere-se ao (+)-enantiômero e o segundo pico ao (-)-enantiômero da MQ. Posteriormente, *n*-desmetildiazepam foi escolhido como padrão interno para o desenvolvimento do método.

Figura 17. Cromatograma referente à resolução dos enantiômeros da MQ (1 e 2) e CMQ (3) na coluna Chiralcel OD-H. Condições: fase móvel: hexano/etanol/DEA/TFA (95:5:0,1:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ : 285 nm.

4.3 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA POR PAR-IÔNICO – MQ E CMQ

Sendo a MQ ($pK_a = 8,5$) e o principal metabólito CMQ ($pK_a = 4,5$), compostos de caráter básico e ácido, respectivamente, o que impossibilitaria a extração em uma única etapa destas substâncias, optou-se pelo

desenvolvimento de um método empregando a LPME simultânea destes analitos pelo princípio da formação de pares-iônicos.

A extração de fármacos hidrofílicos contendo grupos ionizáveis, portanto normalmente incapazes de sofrerem partição com solventes orgânicos, pode ser efetuada pelo princípio da formação de pares-iônicos entre o analito de interesse e um reagente adicionado à solução contendo a amostra ou à fase orgânica (McDOWALL, 1989). Nesta técnica, o reagente iônico (ou transportador) presente na forma carregada na solução doadora forma um complexo lipofílico com o analito também carregado, permitindo o transporte através da membrana orgânica (SMEDES; KRAAK; POPPE, 1982). Recentemente, o princípio foi empregado na LPME para fármacos com $\log P$ (coeficiente de partição óleo/água) menor que 1 (HO et al., 2003).

4.3.1 Tipo de reagente iônico

Há duas formas de emprego desta técnica de extração, adicionando-se um reagente aniônico (Q^-) ou catiônico (Q^+) à amostra, onde o pH terá papel crucial na extração. Dentre os reagentes catiônicos, as aminas quaternárias contendo cadeias alquila (confere maior hidrofobicidade) são bastante utilizadas para extração de compostos carboxilados (KRAMER; ANDREWS, 2001). Então, o processo de extração em meio alcalino ocorrerá como indicado na Figura 18:

Figura 18. Ilustração do processo de extração utilizando-se aminas quaternárias como reagentes catiônicos.

Avaliando-se as aminas quaternárias disponíveis (trioctilamina, tetrabutilamônio e cetildimetiletilamônio), verificou-se que o difosfato de tetrabutilamônio, adicionado à fase doadora, ofereceu melhores resultados, sendo então selecionado para a etapa seguinte do trabalho.

4.3.2 Seleção do solvente orgânico

Dentre os fatores importantes na extração utilizando-se aminas quaternárias para a formação de pares-iônicos, pode-se citar: o pH da fase aquosa (deve estar na faixa alcalina, para que o grupo carboxílico do analito esteja carregado, favorecendo a formação do par-iônico); concentração do cátion (geralmente, um aumento na concentração acarreta melhora na extração); natureza do cátion (o coeficiente de distribuição aumenta com o uso de aminas mais hidrofóbicas) e do solvente orgânico (SMEDES; KRAAK; POPPE, 1982).

Logo, a próxima etapa foi a seleção do solvente orgânico ideal para a extração dos analitos segundo esta metodologia. Visto que na LPME o solvente orgânico deve apresentar certas características (compatibilidade com a fibra, baixa volatilidade, afinidade pelo analito proposto e baixa solubilidade ou insolubilidade em água), vários solventes foram avaliados, incluindo tolueno, *n*-

octanol, éter dibutílico, isooctano e acetato de *n*-butila, além de misturas destes. Observou-se que o tolueno ofereceu maior recuperação da MQ, porém o uso isolado do solvente não extraía o par-iônico proposto. No entanto, a mistura de tolueno e *n*-octanol apresentou recuperação notável da CMQ utilizando-se do princípio de par-iônico aplicado (Figura 19):

Figura 19. Seleção do solvente orgânico – LPME simultânea MQ e CMQ.

O comportamento observado pode ser devido ao fato do complexo CMQ e amina quaternária possuir caráter polar residual requerendo solventes de média polaridade (ex.: *n*-octanol e clorofórmio) para extração, apesar do par-iônico formado apresentar propriedades hidrofóbicas em relação aos compostos isoladamente. Além disso, álcoois lipofílicos (como o *n*-octanol) possuem características únicas, atuando como doadores e aceptores de prótons, importante na solvatação de pares-iônicos (EKSBERG et al., 1973). Vale ressaltar que clorofórmio e diclorometano, bastante utilizados em técnicas de extração por pares-iônicos, não foram utilizados por apresentarem alta volatilidade, característica indesejável em LPME. Com isso, verificou-se que o

uso de tolueno:*n*-octanol como fase orgânica e tetrabutilamônio como reagente iônico adicionado à fase doadora em meio alcalino possibilita a extração simultânea da CMQ e dos enantiômeros da MQ.

Não obstante a maior recuperação do par iônico observada com o *n*-octanol (Figura 20), tal solvente apresenta menor seletividade, acarretando também a co-extração de inúmeros interferentes endógenos, mesmo trabalhando-se em comprimentos de onda mais elevados (285 nm). Com isso, o método de extração desenvolvido necessitaria de técnicas de detecção mais seletivas (ex.: espectrometria de massas) para a quantificação dos analitos, afastando-se então do escopo do trabalho. Logo, optou-se pelo desenvolvimento de um método de extração apenas para a MQ.

Figura 20. Cromatogramas referentes a um branco de plasma (A) e plasma fortificado com 250 ng mL^{-1} de (+)-(RS)-MQ (1) e (-)-(SR)-MQ (2); 500 ng mL^{-1} de CMQ (3) e 250 ng mL^{-1} de *n*-desmetildiazepam (PI) (4). Condições de extração: tempo (30 minutos); velocidade de agitação (700 rpm); fase orgânica: tolueno:octanol (9:1); difosfato de tetrabutilamônio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (100 μL); NaOH 2 mol L^{-1} (50 μL). Condições de análise: coluna Chiralcel OD-H; fase móvel: hexano/etanol/DEA/TFA (95:5:0,1:0,05, v/v); vazão: 1 mL min^{-1} , λ : 285 nm.

4.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DA MEFLOQUINA – TRÊS FASES

Após os resultados preliminares obtidos no desenvolvimento de um método empregando a LPME aplicando-se o princípio da formação de pares-iônicos, resolveu-se então a realização de uma outra técnica de LPME, porém em um sistema de três fases para a análise da MQ.

Tal escolha deveu-se ao fato de um sistema de três fases conferir maior seletividade ao método (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002), possibilitando então o uso de comprimentos de onda mais baixos visando melhorar a detectabilidade do método (inclusive em 222 nm, comprimento de onda de absorção máxima da MQ). Para tanto, passou-se a utilizar a coluna Chiralpak AD, juntamente com a fase móvel hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), para a separação dos enantiômeros, visto ter demonstrado resolução satisfatória destes anteriormente; nessas condições a CMQ não elui. A verificação da ordem de eluição mostrou que o primeiro pico refere-se ao (-)-enantiômero e o segundo pico ao (+)-enantiômero da MQ (Figura 21).

Uma possível desvantagem atribuída à LPME é a perda de precisão ocasionada pela operação manual do procedimento incluindo a preparação, impregnação e acomodação da fibra no sistema, além do fato de se trabalhar com um pequeno volume de extrato (DIETZ; SANZ; CÁMARA, 2006). Logo, é fundamental na quantificação das amostras o uso de padronização interna. Neste caso, verificamos a adequação da mirtazapina como padrão interno, visto ser um fármaco de caráter básico, com coeficiente de partição próximo ao da MQ e completamente resolvido dos analitos nas condições cromatográficas

Figura 21. Cromatograma referente à resolução dos enantiômeros da MQ (1 e 4) na coluna Chiralpak AD. Condições: fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ : 222 nm. Os picos 2 e 3 referem-se aos enantiômeros da mirtazapina (padrão interno).

testadas. Para tanto, o primeiro pico desta substância no cromatograma foi utilizado como padrão interno (PI).

Logo, alguns parâmetros importantes no processo de microextração em fase líquida foram avaliados: tipo de membrana capilar, seleção do solvente orgânico, tempo de extração, velocidade de agitação, pH da fase doadora, concentração de hidróxido de sódio, seleção da fase aceptora, adição de etanol na fase aceptora, adição de sais e metanol na fase doadora. Estes parâmetros fundamentais na otimização do método são discutidos a seguir.

4.4.1 Fibra cilíndrica hidrofóbica

As membranas capilares empregadas em LPME devem ser hidrofóbicas, além de compatíveis com os solventes orgânicos utilizados. Tais requisitos são cumpridos pelas membranas baseadas em polipropileno, disponíveis comercialmente. Destas, a mais comum apresenta diâmetro interno de 600 μm , compatível com os microlitros de fase aceptora aplicados. Outra característica desejável é a espessura da parede (200 μm), oferecendo excelente estabilidade mecânica durante a extração. Finalizando, o tamanho dos poros (0,2 μm) fornece eficaz microfiltração, impedindo a passagem de macromoléculas (ex.: proteínas). Com base nessas propriedades, optou-se pelo desenvolvimento do método empregando-se membranas capilares de polipropileno (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999). Vale também ressaltar que o comprimento da fibra utilizado (6,5 cm) foi definido pela facilidade de manuseio apresentado, além da adequação às dimensões dos frascos disponíveis.

4.4.2 Seleção do solvente orgânico

Uma etapa fundamental na otimização de métodos na LPME é a seleção do solvente orgânico utilizado. Geralmente, solventes orgânicos imiscíveis em água com diferentes polaridades ou misturas destes são testados (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Algumas propriedades são necessárias para um solvente orgânico ser empregado em LPME, dentre elas: baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa (doadora); baixa

volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; compatibilidade com a membrana capilar utilizada (no caso, polipropileno) e fácil impregnação nos poros da mesma e solubilidade adequada para o analito de interesse (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Com base no exposto, *n*-octanol, éter dibutílico e éter diexílico, utilizados previamente em outros trabalhos empregando LPME (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003), foram selecionados para avaliação (Figura 22). O resultado obtido demonstrou maior recuperação nas extrações feitas com o éter diexílico, solvente de menor polaridade que os demais. Além disso, em estudos anteriores o fármaco apresentou afinidade com solventes do grupo éter (BERGQVIST; HELLGREN; CHURCHILL, 1988). Portanto, o éter diexílico foi selecionado para as análises posteriores.

Figura 22. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: tempo de extração (30 minutos); velocidade de agitação (870 rpm); fase acceptora ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); adição de $100 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 4 \text{ mol L}^{-1}$ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL^{-1}); análises em triplicata.

4.4.3 Tempo de extração

A eficiência da extração na LPME em três fases depende da transferência de massa do analito da fase doadora (aquosa) para a orgânica e

desta para a fase aceptora (também aquosa). Visto que a transferência de massa é um processo dependente do tempo, o papel do tempo de extração deve ser verificado (BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE, 2003).

Assim como em outras técnicas de microextração (ex.: SPME), a LPME é um processo dependente do equilíbrio, normalmente necessitando de um período de exposição razoável para alcançá-lo (SHEN; LEE, 2002). Neste caso, a quantidade máxima a ser extraída será atingida quando o equilíbrio for atingido (LORD; PAWLISZYN, 2000).

No experimento realizado (Figura 23), a cinética de extração mostrou-se similar à estudos demonstrados em outros trabalhos (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; BASHEER; LEE; OBBARD, 2004). No entanto, pode-se verificar que até o tempo máximo avaliado (60 minutos), não foi atingido o equilíbrio de extração. Acredita-se que tal comportamento possa ser devido ao alto grau de ligação protéica exibido pelo fármaco, reduzindo então a velocidade de difusão entre as fases (UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003).

Figura 23. Avaliação da influência do tempo de extração. Condições de extração: fase orgânica (éter diexílico); velocidade de agitação (870 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata.

Apesar de períodos de extração prolongados fornecerem maiores recuperações, o emprego de métodos com elevado tempo de preparo da amostra não é desejável na prática, pois prejudicaria o processamento de um grande número de amostras (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Portanto, o tempo de extração de 30 minutos foi estabelecido no método.

4.4.4 Velocidade de agitação

Normalmente, a agitação da amostra é aplicada para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora – solvente orgânico. Logo, diminui-se o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2005).

Na SDME, o uso de velocidades de agitação elevadas (acima de 600 rpm) provoca a perda da fase aceptora presente na ponta da agulha, prejudicando a quantificação dos analitos. Por outro lado, na LPME, a fase aceptora está contida no interior da fibra cilíndrica, possibilitando o emprego de velocidades mais elevadas de agitação (SHEN; LEE, 2002). No teste realizado, empregou-se velocidades de agitação no intervalo de 250 a 1100 rpm, conforme demonstrado na Figura 24.

Verifica-se que a aplicação da agitação aumentou dramaticamente a extração, atingindo um valor máximo em 1100 rpm. Com base nessas observações, a velocidade de agitação foi fixada em 1100 rpm.

Figura 24. Avaliação da influência da velocidade de agitação. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); fase aceptora ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); adição de $100 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 4 \text{ mol L}^{-1}$ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL^{-1}); análises em triplicata.

4.4.5 Avaliação do pH da amostra

Assim como na LLE convencional, a LPME fundamenta-se na partição do analito entre as fases aquosa-orgânica. Portanto, o ajuste do pH da amostra é necessário para manter os analitos na forma não-protonada, favorecendo então a partição do analito na fase orgânica (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Sendo a MQ um composto de caráter básico ($\text{pK}_a = 8,5$), o pH da amostra deverá estar na faixa alcalina. Com isso, a influência do pH da extração foi analisada no intervalo de 6 a 13, conforme mostra a Figura 25:

Figura 25. Avaliação da influência do pH da fase doadora. Condições de extração: Tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (HCl 0,1 mol L⁻¹); concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); tampões utilizados: fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 6,0); borato 0,05 mol L⁻¹ (pH 10,0); fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 12,0). Para pH 13, adicionou-se 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹. Análises em triplicata.

Pode-se observar um aumento gradual da extração utilizando-se valores de pH mais elevados, com acréscimo notável em pH 13 (uso de hidróxido de sódio 4 mol L⁻¹). Tal resultado encontra-se de acordo com dados na literatura, onde o pH da amostra deve diferir dos valores de pK_a do analito em 2 a 3 unidades, para extração eficaz (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Por conseguinte, a próxima etapa seria a seleção da concentração ideal de hidróxido de sódio, segundo a Figura 26:

Figura 26. Seleção da concentração de hidróxido de sódio. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase acceptora (HCl 0,1 mol L⁻¹); volume de solução de NaOH (100 µL); concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata.

Com relação à concentração de hidróxido de sódio, notou-se aumento crescente na extração com o uso de concentrações mais elevadas (valor máximo – NaOH 10 mol L⁻¹). Acredita-se que o emprego de altas concentrações de hidróxido de sódio provoca um certo grau de precipitação protéica (desnaturação), liberando o fármaco presente na amostra, além de diminuir a viscosidade da matriz, facilitando a difusão na membrana capilar (ANDERSEN et al., 2002; UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003). Logo, passou-se a utilizar 100 µL de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹ nos experimentos seguintes.

4.4.6 Seleção da fase acceptora

Na LPME de três fases direcionada para fármacos de caráter básico, o pH da fase acceptora deverá estar na faixa ácida (diferentemente da fase doadora), promovendo eficaz protonação dos analitos, evitando-se assim a retenção na fase orgânica e favorecendo a partição na fase acceptora aquosa

(PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Com base nisso, diferentes soluções aquosas ácidas foram testadas, conforme mostra a Figura 27:

Figura 27. Seleção da fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); adição de 100 μL de NaOH 4 mol L^{-1} na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL^{-1}); análises em triplicata.

A fase aceptora foi selecionada avaliando-se soluções ácidas minerais (ácido perclórico 10 mmol L^{-1}) e orgânicas (ácidos acético e trifluoroacético, ambos na concentração 100 mmol L^{-1}). Verificou-se que o uso do ácido perclórico, um ácido mineral forte, ofereceu maior recuperação, devendo-se principalmente pela eficaz protonação do analito (PEDERSEN-BJERGAARD; HO; RASMUSSEN, 2002). Portanto, o ácido perclórico foi escolhido para composição da fase aceptora.

4.4.7 Adição de etanol na fase aceptora

Em outros estudos empregando a LPME em três fases, a adição de modificadores orgânicos (metanol ou etanol) na fase aceptora melhorou a solubilidade do analito na solução aquosa, promovendo então aumento na extração (PEDERSEN-BJERGAARD; HO; RASMUSSEN, 2002; KUURANNE et

al., 2003). Por conseguinte, foi verificado o efeito de diferentes concentrações de etanol (10, 20 e 30%) na fase aceptora, de acordo com a Figura 28:

Figura 28. Influência da adição de etanol na fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata.

Infelizmente, o resultado observado não foi favorável, notando-se diminuição da recuperação dos analitos com o aumento na proporção de etanol na fase aceptora. Tal fato pode ser devido principalmente à evaporação do solvente orgânico durante a extração com o uso de quantidades maiores (KUURANNE et al., 2003). Então, decidiu-se manter a fase aceptora isenta de modificadores orgânicos.

4.4.8 Adição de sais na fase doadora

A adição de sais à solução contendo a amostra pode ser útil na melhora da extração, dependendo da natureza do analito de interesse (particularmente os mais polares). Em certos casos, o aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, devido ao efeito denominado *salting-out* (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Neste processo, as moléculas de água

hidratam os íons adicionados, ocorrendo então a redução de moléculas do analito dissolvidos na solução aquosa por mecanismos de competição (ULRICH, 2000). Por outro lado, a interação das moléculas do analito com os íons adicionados pode reduzir a difusão do analito para a fase extratora (SHEN; LEE, 2002; LORD; PAWLISZYN, 2000); além disso, o aumento da viscosidade da matriz também prejudica a extração (UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003). Dentre os sais utilizados para verificação deste efeito, o cloreto de sódio é o mais comum. Para tanto, o experimento foi realizado adicionando-se diferentes concentrações de NaCl (5, 10 e 20%) na fase doadora (Figura 29):

Figura 29. Influência da adição de sais na fase doadora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata.

O resultado obtido demonstra uma diminuição na eficiência da extração com o aumento na quantidade de sais adicionados na fase doadora, corroborando outros estudos realizados (ANDERSEN et al., 2003; HOU; LEE, 2004). Lord e Pawliszyn (2000) propuseram uma correlação entre o coeficiente de partição óleo/água e o efeito favorável da adição de sais onde analitos de menor log *P* apresentaram melhores resultados. Visto que a mefloquina (log *P*

próximo à 4) é um analito de média polaridade, o mecanismo *salting-out* não foi eficaz na extração. Logo, decidiu-se manter a fase doadora isenta de sais nas análises posteriores.

4.4.9 Adição de metanol na fase doadora

A MQ apresenta ampla ligação às proteínas plasmáticas (~98%), devendo ser liberada para ocorrer a extração (KARBWANG; WHITE, 1990). Para tanto, vários modos são disponíveis para suprimir a ligação fármaco-proteína, incluindo diluição da matriz e alteração do pH (promovendo a quebra de ligações fracas e iônicas, respectivamente). Outra forma bastante utilizada é a adição de um modificador orgânico na fase doadora, principalmente o metanol, o qual possui a capacidade de romper interações hidrofóbicas e polares entre o analito e as proteínas (UGLAND; KROGH; RASMUSSEN, 2000; HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002). Portanto, decidiu-se avaliar o efeito da adição de metanol na fase doadora em diferentes proporções (5, 10 e 20%), conforme a Figura 30.

Verifica-se que a extração do fármaco utilizando-se metanol na faixa de 0-10% é praticamente inalterada. Porém, adição de 20% do modificador orgânico provocou aumento significativo na recuperação da mefloquina, sendo então considerada a quantidade necessária para eficaz supressão das interações fármaco-proteína. Entretanto, tal quantidade de metanol (800 µL) é demasiadamente alta para o desenvolvimento de metodologias visando o uso reduzido de solventes orgânicos. Logo, optou-se pela permanência da fase doadora isenta de metanol.

Figura 30. Influência da adição de metanol na fase doadora. Condições de extração: tempo de extração (30 min); fase orgânica (éter diexílico); velocidade de extração (1100 rpm); fase aceptora (ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹); adição de 100 µL de NaOH 4 mol L⁻¹ na fase doadora; concentração de cada enantiômero (250 ng mL⁻¹); análises em triplicata.

4.4.10 Procedimento de microextração em fase líquida otimizado

Após a verificação e definição de alguns parâmetros importantes na LPME em três fases, as condições otimizadas no preparo das amostras são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Procedimentos otimizados para microextração em fase líquida - três fases.

<i>Fase</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Variável</i>
Matriz plasmática (1 mL)	Ajuste de pH	Adição de 100 µL de NaOH 10 mol L ⁻¹
	Adição de NaCl	Não
	Adição de metanol	Não
Solvente orgânico	Tipo	Éter diexílico
Fase aceptora	Tipo	HClO ₄ 0,01 mol L ⁻¹
	Adição de etanol	Não
Outros	Membrana capilar	Polipropileno (6,5 cm de comprimento)
	Tempo de extração	30 minutos
	Velocidade de agitação	1100 rpm

A figura 31 apresenta um cromatograma de uma amostra de plasma livre do fármaco e outra de plasma fortificado com MQ, analisadas pelo método proposto.

Figura 31. Cromatogramas referentes a um branco de plasma (A) e plasma fortificado (B) com 500 ng mL^{-1} de (-)-(SR)-MQ (1) e (+)-(RS)-MQ (4) e 375 ng mL^{-1} de (+)-(S)-MT (2) e (-)-(R)-MT (3) (padrão interno). Condições de extração: conforme a Tabela 6. Condições de análise: coluna Chiralpak AD, fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min^{-1} , λ : 222 nm.

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

No início da década de setenta, estudos interlaboratoriais mostraram enorme variação nos dados obtidos e submetidos a órgãos governamentais para avaliação do risco na exposição à substâncias químicas. A partir de então, houve preocupação com o estabelecimento de normas regulamentadoras de programas de qualidade de serviços (CHASIN et al., 1994).

Os métodos analíticos empregados na determinação quantitativa de fármacos e metabólitos em amostras biológicas têm papel fundamental no

fornecimento de dados de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética. Logo, é essencial o emprego de métodos plenamente avaliados fornecendo então interpretações corretas da situação (SHAH et al., 2000). Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer o processo denominado validação (RIBANI et al., 2004). A validação de métodos analíticos é necessária para avaliar a adequação de um método em relação à finalidade proposta.

Para um método bioanalítico ser implementado em uso rotineiro, primeiramente ele deve ser validado para demonstrar a adequação e confiabilidade ao objetivo proposto. Com isso, vários parâmetros importantes são analisados, como: linearidade, recuperação, limite de quantificação, precisão, exatidão, bem como estudos de estabilidade e seletividade (ROSING et al., 2000). Além destes, no caso de análise enantiosseletiva, recomenda-se a realização de estudos de racemização (DUCHARME et al., 1996). A seguir, estão dispostas as informações referentes aos parâmetros analisados na validação do método desenvolvido.

4.5.1 Linearidade

Normalmente, a linearidade é a primeira etapa do método a ser validada. De acordo com a definição da ICH (*International Conference on Harmonization*), a linearidade de um procedimento analítico é a habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (HARTMANN et al., 1998).

Na prática, a linearidade é determinada pela análise de uma série de calibradores, ou seja, soluções de diferentes concentrações, abrangendo a

faixa de concentração de interesse, utilizando-se matrizes fortificadas (CHASIN et al., 1998). A curva analítica deve ser construída usando-se pelo menos cinco valores (excluindo-se o branco) no intervalo esperado de concentrações (BRESSOLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996).

As curvas analíticas devem ser apresentadas juntamente com um tratamento adequado, incluindo a equação da função (usualmente uma reta), a análise de regressão e os dados de correlação e determinação. Embora alguns procedimentos analíticos possam requerer calibração não-linear, geralmente usa-se o modelo linear, onde a variável independente (*eixo horizontal ou x*) é a concentração e a variável dependente (*eixo vertical ou y*) é a resposta. Geralmente, utiliza-se a regressão linear dos mínimos quadrados para definir a reta de calibração (BRAGGIO et al., 1996). O intervalo dinâmico ou faixa linear utilizável é calculado pelo coeficiente de correlação de Person (r) ou coeficiente de determinação (r^2) da curva analítica, usando-se o limite de quantificação como o mais baixo calibrador (CHASIN et al., 1998).

Para a construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método, foram empregadas amostras de plasma fortificadas com soluções-padrão de MQ, no intervalo de 50 a 1500 ng de cada enantiômero por mL de plasma. O tratamento estatístico das curvas analíticas envolveu a determinação da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e do coeficiente de determinação (r^2).

Os dados apresentados na Figura 32 evidenciam linearidade satisfatória no intervalo de concentrações plasmáticas selecionado, com coeficientes de determinação (r^2) > 0,998 para ambos enantiômeros do fármaco. Além disso,

os desvios nominais mantiveram-se abaixo de 15% em todas as concentrações avaliadas.

Figura 32. Regressão linear das curvas analíticas obtidas para os enantiômeros da MQ no intervalo de concentração plasmática de 50 a 1500 ng mL⁻¹, segundo o método proposto.

4.5.2 Recuperação

Durante a preparação das amostras, perdas do analito podem ocorrer durante as várias etapas do processo (ROSING et al., 2000). Portanto, é necessária a avaliação da recuperação, relacionada à eficiência de extração do método analítico (SHAH et al., 2000).

É importante avaliar a recuperação em várias concentrações (alta, média e baixa), uma vez que esta pode variar bastante em concentrações muito baixas (LANÇAS, 2004). Apesar de altas recuperações serem desejáveis, baixas recuperações precisas, consistentes e reprodutíveis são aceitas (SWARTZ; KRULL, 2003). Entre vários autores, há concordância de que o valor da recuperação não é primordial, caso o limite de quantificação, precisão

e exatidão sejam aceitáveis para o método proposto (HUBERT et al., 1999; PETERS; MAURER, 2002).

A recuperação foi avaliada utilizando-se de amostras fortificadas em três níveis de concentração (alta, média e baixa), submetidas ao processo de extração e analisadas com base em curvas analíticas das soluções-padrão não-submetidas ao processo de extração.

Na Tabela 7 pode ser observado que os valores de recuperação média dos enantiômeros da MQ foram superiores a 30%, valor satisfatório para técnicas de microextração (LORD; PAWLISZYN, 2000). Os coeficientes de variação não superiores a 10% indicam boa repetibilidade do procedimento de extração para amostras fortificadas com as concentrações dos enantiômeros do fármaco.

Tabela 7. Recuperação média dos enantiômeros da MQ em plasma pelo método proposto (valores em porcentagem).

<i>Concentração nominal (ng mL⁻¹)</i>	<i>(-)-(SR)-MQ</i>		<i>(+)-(RS)-MQ</i>	
	Recuperação	CV	Recuperação	CV
150	35,5	5,5	36,7	6,3
600	32,3	4,7	33,1	5,9
1200	31,9	8,3	35,3	9,5
Intervalo (150-1200)	33,2	5,9	35,0	5,1

* Análises em triplicata para cada concentração; CV: coeficiente de variação.

4.5.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é considerado como a menor concentração do fármaco quantificada com precisão e exatidão inferiores a 20% (CAUSON, 1997), devendo estar incluída na curva analítica (CHASIN et

al., 1998). Para o método proposto, a menor concentração avaliada do analito foi 50 ng mL^{-1} , com valores de coeficiente de variação e erro relativo inferiores a 15% (Tabela 8). Sendo assim, o LQ do método desenvolvido é 50 ng mL^{-1} .

4.5.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão determinam o erro da medição analítica e são considerados parâmetros primários na avaliação da qualidade do método analítico (KARNES; SHIU; SHAH, 1991).

A precisão em validação de métodos representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, sendo considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade (precisão intra-ensaio ou intracorrída) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (CHASIN et al., 1994).

A precisão intermediária indica o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. É também denominada de precisão interensaio ou intercorrída (RIBANI et al., 2004).

Já a reprodutibilidade refere-se ao grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas. Designa a fidelidade entre laboratórios, geralmente obtida em análises colaborativas (LANÇAS, 2004).

O FDA recomenda o mínimo de cinco replicatas por concentração e, no mínimo três concentrações no intervalo esperado. Além disso, indica desvio menor que 15% em relação ao valor verdadeiro, com exceção do limite de quantificação, para o qual se aceita até 20% (SWARTZ; KRULL, 2003).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). É avaliada através da inexatidão ou *bias*, ou seja, o afastamento entre os valores esperado e obtido (CHASIN et al., 1998).

Da mesma forma que na precisão, o FDA recomenda o mínimo de cinco replicatas por concentração e, no mínimo três concentrações no intervalo esperado. Além disso, indica erro menor que 15% em relação ao valor verdadeiro, com exceção do limite de quantificação, para o qual se aceita até 20% (SWARTZ; KRULL, 2003). A exatidão deve ainda ser determinada em uma mesma corrida analítica (intra-ensaio) e em corridas diferentes (interensaios)(ANVISA, 2003).

Na prática, precisão e exatidão são determinadas comparando-se os resultados obtidos a partir de amostras certificadas ou adicionadas de padrão (LANÇAS, 2004). Na última opção, é feita a adição de uma quantidade conhecida do analito de interesse à matriz, sendo então submetida ao método de análise (CHASIN et al., 1998).

Para avaliar a precisão e exatidão do método desenvolvido, foram empregadas amostras de plasma fortificadas em três níveis de concentração plasmática (alta, média e baixa). A precisão interensaios foi avaliada durante

três dias consecutivos, em quintuplicata e a precisão intra-ensaio foi feita pela análise de cinco amostras no mesmo dia.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão. Através da análise dos valores observa-se que o método proposto apresenta alta precisão e exatidão, visto que os coeficientes de variação e erros relativos mantiveram-se abaixo de 15%, aceitáveis para a análise de fármacos em fluidos biológicos.

Tabela 8. Precisão, exatidão e limite de quantificação do método proposto para análise dos enantiômeros da MQ em plasma.

<i>Concentração nominal (ng mL⁻¹)</i>	<i>Concentração obtida (ng mL⁻¹)</i>		<i>Precisão^a</i>		<i>Exatidão^b</i>	
	<i>(-)-(SR)-</i>	<i>(+)-(RS)-</i>	<i>(-)-(SR)-</i>	<i>(+)-(RS)-</i>	<i>(-)-(SR)-</i>	<i>(+)-(RS)-</i>
Intra-ensaio^c						
50 ^d	55,4	57,3	9,9	12,5	10,8	14,6
150	154,5	150,1	9,6	9,8	3,0	0,1
600	564,8	544,9	4,5	8,5	-5,8	-9,1
1200	1301,3	1308,8	7,1	9,4	8,4	9,0
Interensaios^e						
150	150,8	144,3	12,7	12,4	0,5	-3,7
600	541,1	527,0	6,6	7,9	-9,8	-12,1
1200	1166,2	1179,6	12,7	14,3	-2,8	-1,6

^a coeficiente de variação (%); ^b erro relativo (%); ^c quintuplicata para cada concentração; ^d limite de quantificação; ^e análises em três dias consecutivos.

4.5.5 Estudo de estabilidade

A estabilidade do fármaco durante o procedimento analítico constitui um pré-requisito para a quantificação confiável do analito presente em amostras biológicas (PETERS; MAURER, 2002). O objetivo do estudo de estabilidade é detectar qualquer degradação do analito de interesse, durante os vários

estágios da análise, incluindo coleta, processamento, armazenamento, preparo e análise propriamente dita (ROSING et al., 2000).

Diferentes fatores podem afetar a estabilidade do analito em amostras biológicas, incluindo a natureza do analito, as condições de armazenamento (tempo, temperatura e proteção da luz) e a matriz estudada (SWARTZ; KRULL, 2003). Caso haja qualquer indício de instabilidade, aditivos próprios (ex.: soluções-tampão, antioxidantes, inibidores enzimáticos, etc.) são utilizados para minimizar a degradação (KARNES; SHIU; SHAH, 1991).

Na prática, amostras fortificadas são utilizadas para realização dos ensaios de estabilidade, extrapolando-se então os resultados obtidos para amostras reais. Concomitantemente, são analisadas amostras frescas na mesma concentração e matriz biológica das amostras de estudo (HARTMANN et al., 1998). Para tanto, pode-se utilizar o teste *t* de Student para verificação de diferenças entre os grupos. Havendo diferenças estatisticamente significativas, o analito é considerado instável nas condições estabelecidas (ROSING et al., 2000).

Com base no exposto, foi avaliada a estabilidade dos enantiômeros da MQ nas amostras estocadas à temperatura ambiente durante 12 horas e após ciclos de congelamento e descongelamento, conforme recomendado na literatura vigente (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

De acordo com a Tabela 9, pode-se verificar que os enantiômeros da MQ foram estáveis quando estocados à temperatura ambiente ou expostos a ciclos de congelamento e descongelamento, com valores de $p > 0,05$. De qualquer forma, sabendo-se da instabilidade do fármaco na exposição à luz,

utilizou-se frascos âmbar durante o completo desenvolvimento e aplicação do método (TONNESEN, 2001).

Tabela 9. Estabilidade dos enantiômeros da MQ em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e após estocagem à temperatura ambiente.

<i>Concentração nominal</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>(-)-(SR)-MQ</i>	<i>(+)-(RS)-MQ</i>
	valores de <i>p</i> ^a	valores de <i>p</i>
Ciclos de congelamento e descongelamento		
150	0,18	0,21
1200	0,06	0,08
Estocagem à temperatura ambiente		
150	0,32	0,23
1200	0,07	0,18

^a Análise pelo teste *t* de Student com nível de significância de 5% (*p* < 0,05).

Em estudos realizados anteriormente, Schwartz et al. (1982) não observaram degradação do fármaco presente em fluidos biológicos quando as amostras foram expostas ao congelamento ou à temperatura ambiente. Já Wallén et al. (1994), durante o desenvolvimento de método enantiosseletivo da MQ, não detectaram instabilidade dos enantiômeros durante estocagem das amostras por longos períodos.

4.5.6 Teste de racemização

Na análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em amostras biológicas, outro parâmetro a ser observado é a racemização *in vitro*, possível de ocorrer durante as etapas do método (coleta, preparo e análise de

amostras). Para tanto, deve-se efetuar o teste de racemização (DUCHARME et al., 1996).

Avaliou-se a possibilidade de racemização durante o processo de extração e análise cromatográfica através da análise de amostras de plasma fortificadas com os enantiômeros puros de MQ. Nestes ensaios, não foi verificada racemização após o processamento e análise nas condições estabelecidas, visto que foi detectado apenas o enantiômero usado para a fortificação da amostra, conforme mostrado na Figura 33. Da mesma forma, Wallén et al. (1994) e Bergqvist, Doverskog e Al-Kabbani (1994) não observaram racemização do fármaco presente em plasma humano.

Figura 33. Teste de racemização das amostras após extração por LPME. Cromatogramas referentes a um plasma fortificado com (-)-(SR)-MQ (A) e (+)-(RS)-MQ (B), segundo a metodologia desenvolvida. Condições de análise: coluna Chiralpak AD, fase móvel: hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, λ : 222 nm.

4.5.7 Seletividade

A seletividade de um método bioanalítico é a habilidade de medir e diferenciar o analito na presença de outros compostos possíveis de estarem presentes, constituindo um parâmetro de grande importância na análise de matrizes complexas, como fluidos biológicos. Estes incluem metabólitos, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (SHAH et al., 2000). A seletividade pode ser avaliada de várias maneiras. Geralmente, é avaliada comparando-se a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância, não devendo haver interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar separada dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI et al., 2004). Considerando-se que o método desenvolvido será aplicado na análise de plasma de ratos de procedência conhecida, não houve a preocupação em avaliar a interferência de outros fármacos. Por outro lado, a seletividade do método frente aos compostos endógenos é inegável, visto a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados no branco de plasma humano (Figura 31) e de ratos (Figura 34).

4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo-piloto de disposição cinética em ratos. Para tanto, cloridrato de mefloquina racêmico foi administrado por via oral (gavagem) em suspensão aquosa (Tween 80 2%), na dose única de 50 mg/kg, a qual resulta em concentrações plasmáticas em ratos

Figura 34. Cromatogramas referentes a um branco de plasma de rato (A) e amostra de plasma de rato (B) coletado 12 horas após dose oral única de mefloquina (50 mg/kg), processados segundo a metodologia desenvolvida. Picos: (1)(-)-(SR)-MQ; (2)(+)-(S)-MT; (3)(-)-(R)-MT; (4)(+)-(RS)-MQ.

similares as encontradas em humanos após doses terapêuticas (BAUDRY et al., 1997).

A disposição cinética em plasma de ratos demonstrou ser estereosseletiva, em que maiores concentrações de (+)-(RS)-MQ foram obtidas em todos os tempos de análise avaliados, conforme visto na Figura 35. Em estudos anteriores, Baudry et al. (1997) e Souri, Farsam e Jamali (1997) também obtiveram resultados semelhantes no plasma de ratos.

Tal fato pode ser explicado devido à ação de diferentes processos farmacocinéticos enantiosseletivos, como absorção, excreção, metabolismo ou distribuição (BROCKS; MEHVAR, 2003). Porém, os eventos relacionados à absorção e excreção estereosseletivas do fármaco ainda não foram completamente elucidados (BAUDRY et al., 1997).

Figura 35. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ D. P.) *versus* tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos, após dose oral única de mefloquina (50 mg/kg; $n = 3$).

Por outro lado, Koch e Blaschke (1990) demonstraram que (-)-(SR)-MQ sofre biotransformação mais rápida por homogeneizados hepáticos de ratos, sugerindo metabolismo estereosseletivo da MQ. Além do mais, diferenças na distribuição de enantiômeros dependem da afinidade da molécula a proteínas plasmáticas ou teciduais e, visto que o fármaco liga-se em grande quantidade a proteínas plasmáticas (~98%) e interage de forma seletiva com a glicoproteína-P (presente no intestino, fígado, rins e cérebro), haveria então a possibilidade de outro evento estereosseletivo importante na cinética do composto (PHAM et al., 2000).

Vale ressaltar que a disposição cinética dos enantiômeros do fármaco no plasma de ratos é inversa à encontrada em humanos, em que maiores concentrações de (-)-(SR)-MQ são observadas (GIMENEZ et al., 1994; BOURAHILA et al., 1996; HELLGREN et al., 1996; 1997). Logo, verifica-se diferenças entre espécies com relação à farmacocinética estereosseletiva da mefloquina.

4.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido apresentou excelente performance para a determinação dos enantiômeros da MQ em plasma, visto a concordância dos valores obtidos na validação com os recomendados na literatura vigente. Portanto, pode ser utilizado em estudos farmacocinéticos clínicos ou experimentais. Vale ressaltar que o limite de quantificação obtido foi equivalente (GIMENEZ et al., 1993; 1994; WALLÉN et al., 1994) ou menor (SOURI; FARSAM; JAMALI, 1997) que outros relatados anteriormente. Além disso, o método utiliza uma coluna cromatográfica quiral (Chiralpak AD) disponível comercialmente associado à detecção UV bastante empregada nos laboratórios analíticos, evitando-se então os problemas relacionadas à derivatização. Finalmente, introduz o emprego da microextração em fase líquida como técnica de preparo das amostras na análise de antimaláricos em fluidos biológicos, a qual promoveu redução considerável no consumo de solventes orgânicos aliado à grande pré-concentração dos analitos estudados.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação de uma nova metodologia para a determinação enantiosseletiva de mefloquina em plasma. Inicialmente, buscou-se a análise conjunta da MQ e do principal metabólito; o sistema cromatográfico empregando a coluna Chiralcel OD-H e fase móvel hexano/etanol/DEA/TFA ofereceu a separação simultânea da CMQ e dos enantiômeros da MQ, com tempos de retenção e resolução desejáveis. Na próxima etapa, utilizando-se do princípio da formação de pares-iônicos, foi possível obter a extração simultânea da MQ e CMQ, porém a seletividade do procedimento não foi satisfatória. Com isso, focou-se apenas na análise da MQ. Empregando-se a coluna Chiralpak AD com fase móvel constituída por hexano/etanol/DEA (97:3:0,05, v/v/v), obteve-se separação adequada dos enantiômeros da MQ. Utilizando-se uma membrana capilar de polipropileno, juntamente com éter diexílico (fase orgânica) e ácido perclórico 10 mmol L⁻¹ (fase aceptora) como componentes do sistema de três fases, obteve-se excelente isolamento dos interferentes endógenos aliado a um enriquecimento satisfatório dos analitos, sendo então possível a validação do método desenvolvido. A metodologia mostrou-se apropriada para a determinação da MQ em plasma, visto que os dados referentes à validação do método estão em conformidade com os valores recomendados pela literatura vigente. Os dados apresentados indicam que a utilização da LPME é uma alternativa bastante viável para a preparação das amostras de origem biológica, resultando em métodos com precisão, exatidão e detectabilidade iguais ou superiores aos descritos na literatura, com a grande vantagem de uso praticamente nulo de

solventes orgânicos. O método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo-piloto de disposição cinética em ratos. Verificou-se que a disposição cinética da MQ em ratos foi estereosseletiva, já que maiores concentrações plasmáticas de (+)-(RS)-MQ foram observadas em todos os tempos de análise avaliados. Finalmente, o método desenvolvido é simples, rápido e confiável para a determinação enantiosseletiva da MQ em amostras de plasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H. Y. Recent applications of polysaccharide-type chiral stationary phases for the enantioselective analysis of chiral drugs with one and two stereogenic centers. **Biomed. Chromatogr.**, London, v. 12, p. 116-9, 1998.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. **IL Farmaco**, Pavia, v. 57, p. 513-29, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 963, p. 303-12, 2002.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; TANUM, L.; REFSUM, H. Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 33, p. 263-72, 2003.

BANCHANG, K. N.; KARBWANG, J.; BACK, D. J. Mefloquine metabolism by human liver microsomes: effect of other antimalarial drugs. **Biochem. Pharmacol.**, London, v. 43, n. 9, p. 1957-61, 1992.

BASCO, L. K.; GUILLOTIN, C.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R.; LE BRAS, J. Absence of antimalarial activity or interaction with mefloquine enantiomers in vitro of the main human metabolite of mefloquine. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 85, p. 208-9, 1991.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase

microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1016, p. 11-20, 2003.

BASHEER, C.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Application of liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in blood plasma. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1022, p. 161-9, 2004.

BAUDRY, S.; PHAM, Y. T.; BAUNE, B.; VIDREQUIN, S.; CREVOISIER, C. H.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R. Stereoselective passage of mefloquine through the blood-brain barrier in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 49, p. 1086-90, 1997.

BERGQVIST, Y.; HELLGREN, U.; CHURCHILL, F. C. High-performance liquid chromatography assay for the simultaneous monitoring of mefloquine and its acid metabolite in biological samples using protein precipitation and ion-pair extraction. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 18, p. 253-63, 1988.

BERGQVIST, Y.; AL-KABBANI, J.; PETTERSSON, C.; HUYNH, N. H. Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of (SR)- and (RS)-mefloquine in plasma using N-benzyloxycarbonyl-glycyl-L-proline as chiral counter ion. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 620, n. 2, p. 217-24, 1993.

BERGQVIST, Y.; DOVERSKOG, M.; AL-KABBANI, J. High-performance liquid chromatographic determination of (SR)- and (RS)-enantiomers of mefloquine in plasma and capillary blood sampled on paper after derivatization with (-)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 652, p. 73-81, 1994.

BERMUDEZ, J. A. Z.; BARRAGAT, P. Medicamentos quirais: da dimensão química à discussão política. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 47-51, 1996.

BONATO, P. S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; ILHA, M. H.; LIMA, R. P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites on polysaccharide and protein based chiral stationary phases. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 190-9, 2002.

BOOTH, T. D.; WAHNON, D.; WAINER, I. W. Is chiral recognition a three-point process? **Chirality**, New York, v. 9, p. 96-8, 1997.

BOURAHILA, A.; MARTIN, C.; GIMENEZ, F.; SINGHASIVANON, V.; ATTANATH, P.; SABCHEARON, A.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; FARINOTTI, R. Stereoselective pharmacokinetics of mefloquine in young children. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 50, p. 241-4, 1996.

BRAGGIO, S.; BARNABY, R. J.; GROSSI, P.; CUGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 14, p. 375-88, 1996.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.

BROCKS, D. R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 42, n. 15, p. 1359-82, 2003.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-80, 1997.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C.; Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 41-6, 1994.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Tox.**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CORDERO B. M.; PAVÓN, J. L. P.; PINTO, C. G.; LAESPADA, E. F.; MARTÍNES, R. C.; GONZALO, E. R. Analytical application of membrane

extraction in chromatography and eletrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 902, p. 195–204, 2000.

CRAVO, P.; ROSÁRIO, V. Aspectos da genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. **Biomed. Saúde Públ.**, Lisboa, v. 73, p. 2-8, 2002.

DIETZ, C.; SANZ, J.; CÁMARA, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1103, p. 183-92, 2006.

DUCHARME, J.; FERNANDEZ, C.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R. Critical issues in chiral drug analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 686, p. 65-75, 1996.

EKSBORG, S.; LAGERSTRÖM, P.; MODIN, R.; SCHILL, G. Ion-pair chromatography of organic compounds. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 83, p. 99-110, 1973.

EURACHEM Working Group. **EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Teddington, 1998.

FONTAINE, F.; SOUSA, G.; BURCHAM, P.; DUCHENE, P.; RAHMAN, R. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. **Life Sci.**, Oxford, v. 66, n. 22, p. 2193-212, 2000.

GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R.; TAULLIER, A.; HAZEBROUCQ, G.; WAINER, I. W. Determination of the enantiomers of mefloquine in plasma and whole blood using a coupled achiral-chiral high performance liquid chromatographic system. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 529, p. 339-46, 1990.

GIMENEZ, F.; DUMARTIN, C.; WAINER, I. W.; FARINOTTI, R. Improved column-switching liquid chromatographic method for the determination of the enantiomers of mefloquine. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 619, p. 154-60, 1993.

GIMENEZ, F.; PENNIE, R. A.; KOREN, G.; CREVOISIER, C.; WAINER, I. W.; FARINOTTI, R. Stereoselective pharmacokinetics of mefloquine in healthy Caucasians after multiple doses. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 83, n. 6, p. 824-7, 1994.

GREEN, M. D.; BERGQVIST, Y.; MOUNT, D. L.; CORBETT, S.; D'SOUZA, M. J. Improved validated assay for the determination of mefloquine and its carboxy metabolite in plasma, serum and whole blood using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 727, p. 159-65, 1999.

GRINDEL, J. M.; TILTON, P. F.; SHAFFER, R. D. Quantitation of the antimalarial agent, mefloquine, in blood, plasma and urine using high-pressure liquid chromatography. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 66, n. 6, p. 834-7, 1977.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment and a proposed agenda for research and development. **Lancet Infect. Dis.**, London, v. 2, p. 564-73, 2002.

HAGINAKA, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 906, p. 253-73, 2001.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 27, p. 357-72, 2002.

HÅKANSON, A.; LANDBERG-LINDGREN, A.; BJÖRKMAN, A. Comparison of the activity of mefloquine and two metabolites against *Plasmodium falciparum*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 84, p. 503-4, 1990.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed., McGraw Hill, New York, 1996.

HELLGREN, U.; JASTREBOVA, J.; JERLING, M.; KRYSÉN, B.; BERGQVIST, Y.; Comparison between concentrations of racemic mefloquine, its separate enantiomers and the carboxylic acid metabolite in whole blood, serum and plasma. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 51, p. 171-3, 1996.

HELLGREN, U.; BERGGREN-PALME, I.; BERGQVIST, Y.; JERLING, M. Enantioselective pharmacokinetics of mefloquine during long-term intake of prophylactic dose. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 44, n. 2, p. 119-24, 1997.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **Analyst**, London, v. 127, p. 608-13, 2002.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction – comparison with conventional liquid-liquid extraction. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 963, p. 3-17, 2002.

HO, T. S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 998, p. 61-72, 2003.

HOU, L.; LEE, H. K. Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1038, p. 37-42, 2004.

HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; CHEVALIER, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; LAURENTIE, M.; NIVET, J. C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 135-48, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos – DOQ-CGCRE-08**. Rio de Janeiro, 2003.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, p. 2236-40, 1996.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of a solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, p. 235-9, 1997.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 318-25, 1999.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 902, p. 205-25, 2000.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction in analytical chemistry. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 24, p. 495-507, 2001.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction for sample preparation. **LC-GC Europe**, London, Oct 2003.

KARBWANG, J.; WHITE, N. J. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 19, n. 4, p. 264-79, 1990.

KARLE, J. M.; OLMEDA, R.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. *Plasmodium falciparum*: role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol anti-malarial agents. **Exp. Parasit.**, New York, v. 76, p. 345-51, 1993.

KARNES, H. T.; SHIU, G.; SHAH, V. P. Validation of bioanalytical methods. **Pharm. Res.**, Hingham, v. 8, n. 4, p. 421-6, 1991.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 232-44, 2003.

KOCH, M.; BLASCHKE, G. Separation and metabolism of mefloquine enantiomers. **Arch. Pharm.**, Berlin, v. 323, p. 749, 1990.

KRAMER, K. E.; ANDREWS, A. R. J. Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 760, p. 27-36, 2001.

KUBINYI, H. Chemical similarity and biological activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 13, n. 6, p. 717-26, 2002.

KUMAR, Y. R.; RAMULU, G.; VEVAKANAND, V. V.; VAIDYANATHAN, G.; SRINIVAS, K.; KUMAR, M. K.; MUKKANTI, K.; REDDY, M. S.; VENKATRAMAN, S.; SURYANARAYANA, M. V. A validated chiral HPLC method for the enantiomeric separation of tolterodine tartarate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 35, p. 1279-85, 2004.

KUURANNE, T.; KOTIAHO, T.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; LEINONEN, A.; WESTWOOD, S.; KOSTIAINEN, R. Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic-mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. **J. Mass Spectrom.**, New York, v. 38, p. 16-26, 2003.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1072, p. 55-61, 2005.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas: Átomo, 2002.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 902, p. 17-63, 2000.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, N. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 906, p. 3-33, 2001.

MARTIN, C.; GIMENEZ, F.; BANGCHANG, K. N.; KARBWANG, J.; WAINER, I. W.; FARINOTTI, R. Whole blood concentration of mefloquine enantiomers in healthy Thai volunteers. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 45, p. 85-7, 1994.

McDOWALL, R. D. Sample preparation for biomedical analysis. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 492, p. 3-58, 1989.

MILLER, L.; ORIHUELA, R. F.; MURPHY, J. Preparative chromatographic resolution of enantiomers using polar organic solvents with polysaccharide chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 865, p. 211-26, 1999.

MISLANOVÁ, C.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 797, p. 91-109, 2003.

PALMER, K. J.; HOLLIDAY, S. M.; BROGDEN, R. N. Mefloquine: a review of its activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, Basel, v. 45, n. 3, p. 430-75, 1993.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. U. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 71, p. 2650-6, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HO, T. S.; RASMUSSEN, K. E. Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 25, p. 141-6, 2002.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. U. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 817, p. 3-12, 2005.

PERSSON, B.; ANDERSSON, S. Unusual effects of separation conditions on chiral separations. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 906, p. 195-203, 2001.

PETERS, W.; ROBINSON, B. L.; MITTELHOLZER, M. L.; CREVOISIER, C.; STURCHLER, D. The chemotherapy of rodent malaria LII response of *Plasmodium yoelli* ssp. to mefloquine and its enantiomers. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, Liverpool, v. 89, n. 5, p. 465-8, 1995.

PETERS, F. K.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. **Accord. Qual. Assur.**, Berlin, v. 7, p. 441-9, 2002.

PHAM, Y. T.; NOSTEN, F.; FARINOTTI, R.; WHITE, N. J.; GIMENEZ, F. Cerebral uptake of mefloquine enantiomers in fatal cerebral malaria. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, München, v. 37, n. 6, p. 316, 1999.

PHAM, Y. T.; RÉGINA, A.; FARINOTTI, R.; COURAUD, P. O.; WAINER, I. W.; ROUX, F.; GIMENEZ, F. Interactions of racemic mefloquine and its enantiomers with P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1524, p. 212-9, 2000.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 10, p. 565-74, 2003.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QIU, Y.; KITAMURA, S.; GUILLORY, J. K. A high-performance liquid chromatographic method for the quantitative enantioselective analysis of mefloquine stereoisomers. **Pharm. Res.**, Hingham, v. 9, n. 12, p. 1640-3, 1992.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJEGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

RENTSCH, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **J. Biochem. Biophys. Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 1-9, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos**. Ribeirão Preto: Holos, 1998.

ROSING, H.; MAN, W. Y.; DOYLE, E.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Bioanalytical liquid chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v. 23, n. 3, p. 329-54, 2000.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, London, v. 415, p. 680-5, 2002.

SAITO, Y.; JINNO, K. Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1000, p. 53-67, 2003.

SCHWARTZ, D. E.; ECKERT, G.; HARTMANN, D.; WEBER, B.; RICHARD-LENOBLE, D.; EKUE, J. M. K. GENTILINI, M. Single dose kinetics of mefloquine in man. **Chemotherapy**, Basel, v. 28, p. 70-84, 1982.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. **Pharm. Res.**, Hingham, v. 17, n. 12, p. 1551-7, 2000.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Anal. Chem.**, Washington, v. 74, p. 648-54, 2002.

SILVA, L. H.; OLIVEIRA, V. E. G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciênc. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 49-63, 2002.

SMEDES, F.; KRAAK, J. C.; POPPE, H. Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 231, p. 25-39, 1982.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. New York: Wiley, 2001.

SOURI, E.; FARSAM, H.; JAMALI, F. Stereospecific determination of mefloquine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 700, p. 215-22, 1997.

SOURI, E.; FARSAM, H.; ZARE, A. Stereospecific determination of mefloquine in whole blood by HPLC. **Iran. J. Pharmacol. Ther.**, Tehran, v. 2, p. 15-7, 2003.

SWARTZ, M.; KRULL, I. Validation of bioanalytical methods – highlights of FDA's guidance. **LC-GC No. Am.**, New York, v. 21, n. 2, 2003.

TANG, Y. Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on cellulose-based chiral stationary phase. **Chirality**, New York, v. 8, p. 136-42, 1996.

TONNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 225, p. 1-14, 2001.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discov. Today**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 138-47, 1997.

TROCEWICZ, J. Urine sample preparation of tricyclic antidepressants by means of a supported liquid membrane technique for high-performance liquid chromatographic analysis. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 801, p. 213-20, 2004.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 749, p. 85-92, 2000.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 798, p. 127-35, 2003.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 902, p. 167-94, 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-30, 2000.

VAN DER MERBEL, N. C. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography and electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 856, p. 55-82, 1999.

WALLÉN, L.; ERICSSON, O.; WIKSTRÖM, I.; HELLGREN, U. High-performance liquid chromatographic system for the enantioselective analysis of

mefloquine in plasma and urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 655, p. 153-7, 1994.

WILLIAMS, M. L.; WAINER, I. W. Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 24, n. 2, p. 290-6, 2002.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 04.1.784.53.8), intitulado: "Análise Enantiosseletiva da Mefloquina e Carboximefloquina em Plasma: Avaliação técnica de extração líquido-líquido em membranas", de autoria de **Igor Rafael dos Santos Magalhães**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 05.10.2004.

Ribeirão Preto, 6 de outubro de 2004

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretaria da CEUA
Maria Angélica S. Depiro