UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do
ibuprofeno, da hidroxiclороquina e de seus metabólitos em urina**

Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do
ibuprofeno, da hidroxiclороquina e de seus metabólitos em urina**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do título de
Doutor em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Anderson R. M. de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pierina S. Bonato

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

De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxiclороquina e de seus metabólitos em urina

130 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli

1. Análise enantiosseletiva. 2. Preparação de amostra.
3.SPME/LPME

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxiclороquina e de seus metabólitos em urina

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do título de
Doutor em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pierina S. Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha
mãe, “Maria Bunitinha”
Que saudade...*

Agradecimentos

*Agradeço a Deus por tudo que Ele tem feito em minha vida,
pelos momentos difíceis e alegres*

Muito Obrigado, Senhor

*Aos meus pais, Nílo e Nenê, por terem lutado, trabalhando dia e
noite, para que eu pudesse estudar.*

Muito obrigado, Sem vocês nada disso seria possível

Amo vocês

*A minha companheira, esposa e amiga, Franciane, por ter estado
ao meu lado por todo esses 10 anos.*

*Muito obrigado por ter me escolhido para ser seu
Companheiro e pai de seus filhos.*

*Muito obrigado também por ter me dado minha maior
realização, nossa filhinha Clara.*

Amo você

*"Nossos olhos tiveram a mesma culpa, os seus porque me olharam,
os meus porque te quiseram". "*

Agradeço também a Professora Pierina,

É difícil expressar em poucas palavras a gratidão que tenho por você, Pi. Lembro-me de que quando vim para Ribeirão Preto, para fazer Pós-Graduação. Não tinha idéia do que era realmente um Curso de Mestrado, na verdade eu estava perdido. Quando cheguei na sua sala, você aceitou ser minha orientadora, sem me conhecer, sabendo que eu vinha de uma faculdade privada e mais, sabendo que eu nunca tinha tocado em um HPLC.

Lembro-me que te disse: “Mas eu não sei operar esse equipamento” e você disse: “Não se preocupe, você está aqui para aprender”. Isso para mim, foi a maior prova de que todos merecem uma oportunidade, independente de onde vem.

Durante todo esse tempo com você aprendi a te admirar e prometo a você que vou lutar para continuar a ser um profissional cada vez melhor.

Muito Obrigado pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas broncas, pelas risadas...

Espero que você tenha muita luz na sua vida e que você continue a ser essa admirável pessoa que você é. Desejo do fundo de meu coração muita saúde para você e sua família.

Agradecimentos

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto;

Ao nosso grupo de pesquisa Croec (Analú, Carmen, Fernando, Igor, Keyller, Patrícia, Renato, Ricardo) por todos os momentos que vivemos juntos;

Aos técnicos: Ana Paula, Luizinho, Perpétua, Roberto e Valquíria pela apoio em todos momentos;

Ao pessoal da Química Inorgânica, Edgar, Fabiana, Marião, Marília e Renata, pelos momentos de descontração durante o cafézinho;

A secretária, Rosana, pelos auxílios em qualquer hora;

Aos Professores, Luiz Fernando Lopes Guimarães e Cristiane Mazetto de Gaitani pela ajuda em todos os momentos;

Ao funcionários da seção de Pós-Graduação da FCFRP-USP, Rosana, Ana e Eleni;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos e;

A Fapesp pelo auxílio financeiro

RESUMO

DE OLIVEIRA, A. R. M. **Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e de seus metabólitos em urina**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A análise estereosseletiva tem um lugar de destaque em várias áreas e, dentre elas, a farmacêutica, pois diversos fármacos quirais são comercializados como misturas racêmicas. A análise estereosseletiva empregando a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar é prática e bastante eficaz para aplicações que envolvem a determinação de enantiômeros ao nível de traços em matrizes complexas, como por exemplo, em estudos de disposição cinética. Entretanto, devido à complexidade das matrizes biológicas, há necessidade da preparação da amostra antes de sua análise. Entre as diversas técnicas existentes, as mais utilizadas são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Contudo, essas técnicas apresentam algumas desvantagens, sendo a principal delas o uso de grandes quantidades de solventes. Portanto, técnicas que requerem pouco ou nenhum consumo de solventes orgânicos são bastante desejáveis. Entre essas técnicas destacam-se a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME). Essas técnicas relativamente recentes têm como vantagens a utilização de quantidades mínimas de solventes orgânicos, o alto poder de concentração, a remoção dos interferentes da matriz biológica e a simplicidade de automação. Nesse trabalho propusemos a utilização da SPME e LPME como técnicas de preparação de amostras de urina, visando o desenvolvimento de métodos estereosseletivos com detectabilidade e seletividade adequadas para aplicação em estudos posteriores de disposição cinética. A SPME foi empregada para análise estereosseletiva do ibuprofeno e de seus principais metabólitos, carboxiibuprofeno e 2-hidroxiibuprofeno e da hidroxicloroquina e seus principais metabólitos, enquanto que a LPME foi usada para a análise estereosseletiva da hidroxicloroquina e seus metabólitos. Inicialmente, foi realizada a otimização da separação dos fármacos e metabólitos em diversas colunas quirais, a otimização da separação da hidroxicloroquina e seus metabólitos por eletroforese capilar e, em seguida, a otimização dos procedimentos de extração e a validação dos métodos desenvolvidos. Utilizando a coluna Chiralpak AD-RH[®] e fase móvel composta por solução de ácido fosfórico 1 mol L⁻¹ pH 3 : metanol (75 : 25, v/v), foi validado um método para análise enantiosseletiva do ibuprofeno em urina. A SPME foi empregada para extração do ibuprofeno das amostras de urina utilizando a fibra PDMS-DVB 60 µm. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 0,25 a 25 µg mL⁻¹ para cada enantiômero. Para a análise do 2-hidroxiibuprofeno e carboxiibuprofeno, foi utilizada a coluna Chiralpak AS[®] e fase móvel composta por hexano : isopropanol (94 : 6, v/v) + 0,05% de ácido trifluoracético. A extração desses metabólitos foi feita empregando a fibra de CW-TPR 50 µm. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg mL⁻¹. Já para a análise da hidroxicloroquina e seus principais metabólitos, DHCQ e DCQ, foi utilizada a coluna Chiralcel OD-H[®] e fase móvel composta por hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) + 0,2% de dietilamina. A extração desses metabólitos foi feita empregando a fibra de PDMS-DVB 60 µm. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 50 a 1000 ng mL⁻¹ para HCQ e 42 – 416 ng mL⁻¹ para os metabólitos. A microextração em fase líquida foi avaliada na análise da hidroxicloroquina e seus metabólitos, BDCQ, DHCQ e DCQ e separação por eletroforese capilar. Para tanto foi utilizado um capilar de sílica fundida não-recoberto com um comprimento efetivo de 42 cm, e 30 mmol L⁻¹ de HP-β-CD + 1% de CD-β-sulfatada dissolvida em tampão tris(hidroxiaminometano) 100 mmol L⁻¹ pH 9 como tampão de análise. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 10 – 1000 ng mL⁻¹

para HCQ e $21-333 \text{ ng mL}^{-1}$ para os metabólitos. Obteve-se precisão com coeficientes de variação inferiores a 15% e exatidão com erros relativos menores que 15% para todos os métodos desenvolvidos. Após validação, os métodos foram empregados na determinação da quantidade excretada acumulada do do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e de seus metabólitos após administração de de *rac*-ibuprofeno e *rac*-hidroxicloroquina a voluntários sadios. Em suma, as duas técnicas foram eficientes na extração dos fármacos e metabólitos estudados. A SPME mostrou ser uma técnica de mais fácil manuseio, porém com baixos valores de recuperação. Por outro lado, a LPME apresentou valores de recuperação maiores, porém o manuseio do sistema de extração foi mais difícil, necessitando de um tempo maior para o domínio da técnica.

Palavras chave: Microextração em fase sólida, microextração em fase líquida, análise estereosseletiva, ibuprofeno, hidroxicloroquina, metabólitos, urina

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, A. R. M. **Microextraction techniques applied to the stereoselective analysis of ibuprofen, hydroxychloroquine and their metabolites in human urine.** 2007. 126 p. Thesis (Doctoral Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The stereoselective analysis has been standing out in several areas, and it is mainly present in the pharmaceutical industry, since many drugs are marketed as racemic mixtures. The stereoselective analysis employing high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) is very useful for the determination of enantiomers at very low concentrations, as the ones found in biological matrices, for instance, in pharmacokinetic studies. The first step in the analysis of drugs in biological fluids is the extraction procedure. The most common extraction procedures employed are liquid-liquid extraction and solid-phase extraction. These techniques show several drawbacks, such as the high amount of organic solvent consumed. So, based on this fact, techniques that consume small amounts of organic solvents are desirable. Among these techniques, solid-phase microextraction (SPME) and liquid-phase microextraction (LPME) have been stood out. The main advantages of these techniques are the small amount of organic solvent consumed and its high capacity in drug concentration. In this work, our purpose was to employ the SPME and the LPME as sample preparation techniques to develop stereoselective methods to be further applied in pharmacokinetic studies. SPME was employed for the stereoselective analysis of ibuprofen, hydroxychloroquine and their major metabolites. On the other hand, LPME was employed only for the enantioselective analysis of hydroxychloroquine and its metabolites. The first step was the separation optimization of the drugs and their metabolites by HPLC using several chiral columns, and the separation optimization of hydroxychloroquine and its metabolites by CE. Next, the extraction optimizations and method validations were performed. The enantioselective analysis of ibuprofen in human urine was carried out in the Chiralpak AD-RH[®] column, using methanol-pH 3.0 phosphoric acid solution (75 : 25 v/v) as mobile phase. The method was linear over the 0.5 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range for both enantiomers. The fiber used in this method was PDMS-DVB 60 μm . The analysis of 2-hydroxyibuprofen and carboxyibuprofen was performed on a Chiralpak AS[®] column using hexane:isopropanol (95 : 5 v/v) plus 0.05% trifluoroacetic acid as the mobile phase. The method was linear over the 5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range. To perform the extractions, a CW-TPR 50 μm coated fiber was employed. The analysis of hydroxychloroquine and its major metabolites (DCQ and DHCQ) was done on a Chiralcel OD-H[®] column using hexane-methanol-ethanol (96 : 2 : 2, v/v/v) plus 0.2% diethylamine as mobile phase. The extraction was performed using a PDMS-DVB 60 μm coated fiber. The method was linear over the range of 50 – 1000 ng mL^{-1} for HCQ enantiomers and over the range of 42 - 416 ng mL^{-1} for DCQ and DHCQ enantiomers. LPME and CE were applied for the chiral determination of hydroxychloroquine and its metabolites (DCQ, DHCQ, BDCQ) in human urine. The electrophoretic separations were carried out in 100 mmol L^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (pH adjusted to 9.0 with phosphoric acid) containing 1% (w/v) S- β -CD and 30 mg mL^{-1} HP- β -CD, with a constant voltage of +18 kV. The method was linear over the concentration range of 10-1000 ng mL^{-1} for each HCQ stereoisomer and 21-333 ng mL^{-1} for each metabolite stereoisomer. Within-day and between-day assay precision and accuracy for all described methods were lower than 15%. The developed methods were applied for the determination of the cumulative urinary excretion of ibuprofen metabolites and hydroxychloroquine and its metabolites after oral administration of *rac*-ibuprofen and *rac*-hydroxychloroquine to health volunteers. Comparing the techniques, both SPME and LPME were efficient to extract the drugs and their metabolites from human urine.

SPME showed to be an easier technique to handle, however, the drug amount recovered by this technique was too small. On the contrary, LPME was a more difficulty technique to be handled, but better recovery values were obtained with this technique.

Keywords: Solid-phase microextraction, liquid-phase microextraction, stereoselective analysis, ibuprofen, hydroxychloroquine, metabolites, urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (HARRIS, 2005).	9
Figura 2- Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico (HARRIS, 2005).	11
Figura 3- Perfil de fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (fluxo laminar) (B) (HARRIS, 2005) .	12
Figura 4- LPME convencional (A), sistema em “U” utilizando membrana cilíndrica (B) e sistema utilizando a membrana com a ponta fechada (C).	18
Figura 5 -Esquema de LPME em 2 e 3 fases.	19
Figura 6- Membranas utilizadas no processo de LPME (Membrana [®])	20
Figura 7- Esquema do dispositivo para extração direta (A) e “headspace”(B) (ULRICH, 2000)	24
Figura 8- Esquema de dessorção “on-line” modo dinâmico (A) e modo estático (B) (LORD & PAWLISZYN, 2000).	27
Figura 9- Esquema de dessorção “off-line”.	28
Figura 10- Esquema mostrando a inversão metabólica quiral do ibuprofeno.	30
Figura 11- Esquema mostrando a rota metabólica do ibuprofeno (KEPP; SILLELMANN; HANSEN, 1997).	30
Figura 10- Hidroxicloroquina e seus metabólitos, * centro quiral.	35
Figura 13- Sistema de SPME (A) e LPME (B)	41
Figura 14- Esquema para avaliação e otimização da separação por HPLC colunas quirais. As soluções de partida ^(a) são sugeridas pelos respectivos fabricantes das colunas quirais e variam de acordo com as características do analito analisado. Modificadores: ⁽¹⁾ etanol, isopropanol; ⁽²⁾ acetonitrila, metanol. Aditivos: ⁽¹⁾ ácido trifluoracético, (2) dietilamina.	46
Figura 15- Esquema para otimização das condições de SPME. ^a As fibras PDMS-DVB, PA, CW-TPR foram utilizadas no desenvolvimento do método para análise do IBU, enquanto que somente as fibras PDMS-DVB e CW-TPR foram utilizadas no desenvolvimento do método para análise dos metabólitos do IBU e da HCQ e seus principais metabólitos. ^b A otimização do pH foi realizada para o método dos metabólitos do IBU e HCQ e seus principais metabólitos. Todo procedimento de otimização foi realizado em duplicata	48
Figura 16- Esquema para otimização das condições de LPME. Os solventes empregados foram: 1-octanol, acetato de butila, acetato de hexila, acetato de dodecila, éter dibutílico e éter n-hexílico. Todo procedimento de otimização foi realizado em triplicata	51
Figura 17- Melhor separação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos na coluna Chiralcel OD-H [®] . 1-(-)-(R)-DCQ, 2-(+)-(S)-DCQ, 3-(-)-(R)-HCQ, 4-(+)-(S)-HCQ, 5-(-)-(R)-DHCQ, 6-(+)-(S)-DHCQ. Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min ⁻¹ ; detecção em 343 nm.	59

Figura 18- Melhor separação dos estereoisômeros dos metabólitos do ibuprofeno na coluna Chiralpak AD[®]. 2-OHIBu (1) e COOHIBu (2). Fase móvel: hexano : etanol (94:6 v/v) + 0,05% de TFA; vazão de 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

60

Figura 19 Melhor separação dos estereoisômeros dos metabólitos do ibuprofeno na coluna Chiralpak AS[®]. (+)-(S)-2-OHIBu (1), (-)-(R)-2-OHIBu (2), (2'S,2S)-COOHIBu (3), (2'R,2S)-COOHIBu (4), (2'S,2R)-COOHIBu (5), (2'R,2R)-COOHIBu (6). Fase móvel: hexano : isopropanol (95:5 v/v) + 0,05% de TFA; vazão de 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

61

Figura 20- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU obtida na coluna Chiralcel OJ[®], (-)-(R)-IBU (1) e (+)-(S)-IBU (2). Fase móvel: Hexano : etanol (98 : 2 v/v) + 0,05% de TFA; vazão: 1 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

62

Figura 21- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU na coluna Chiralpak AD-RH[®]. (A) Fase móvel: metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v) vazão: 0,45 mL min⁻¹; (B) Fase móvel: acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 2,3 (42 : 58 v/v) vazão : 0,5 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 1-(-)-(R)-IBU, 2-(+)-(S)-IBU.

63

Figura 22- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU na coluna Chiralcel OJ-R[®]. Estereoisômero 1 (1) e Estereoisômero 2 (2). Fase móvel: acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3,5 (40 : 60 v/v); vazão de 0,5 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

64

Figura 23- Cromatogramas do IBU na coluna Chiralpak AD-RH[®]. (A)-Fase móvel: metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v). (B)-Fase móvel : metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v), vazão: 0,45 mL min⁻¹, detecção em 230 nm. 1-(-)-(R)-IBU, 2-(+)-(S)-IBU.

67

Figura 24 - Eletroferograma da HCQ e seus metabólitos após modificação do método. Tampão de análise: tampão tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol L⁻¹ pH ajustado para 9 com ácido fosfórico contendo 1% de β-CD-sulfatada sódica e 30 mg mL⁻¹ de HP-β-CD. Capilar de sílica fundida não-recoberado de 50 μm de diâmetro interno, 50 cm de comprimento total e 42cm de comprimento efetivo, temperatura de análise 20 °C, voltagem aplicada: 18 kV, Injeção hidrodinâmica: 50 mbar durante 30 segundos. 1-(-)-(R)-HCQ, 2-(+)-(S)-HCQ 3-(-)-(R)-DHCQ, 4- (+)-(S)-DHCQ, 5-(-)-(R)-DCQ, 6-(-)-(R)-BDCQ, 7-(+)-(S)-DCQ and 8-(+)-(S)-BDCQ, detecção em 343 nm.

69

Figura 25- Comparação da eficiência de extração do IBU entre as fibras PDMS-DVB, PA e CW-TPR. Extração: 30 minutos a 25°C; NaCl 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25°C. Conc. 1,25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

73

Figura 26- Comparação da eficiência de extração dos metabólitos do IBU entre as fibras PDMS-DVB e CW-TPR. Extração: 30 minutos a 25°C; NaCl 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) a 25°C por 3 minutos. Conc. 25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

73

Figura 27- Comparação da eficiência de extração dos metabólitos da HCQ e seus metabólitos entre as fibras PDMS-DVB e CW-TPR. Extração: 40 minutos a 25°C; NaCl 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) a 25°C por 5 minutos. Conc. (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

74

Figura 28- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75:25 v/v) por 5 minutos a 25°C. Conc. 1,25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero; Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

76

Figura 29- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25°C. Conc.: 25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

76

Figura 30- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25°C. Conc. (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

77

Figura 31- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25°C; dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25°C. Conc.: 1,25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

78

Figura 32- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25°C; dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25°C. Conc.: 25 μg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

79

- Figura 33- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos a 25 °C; dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25 °C. Conc. (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2. 79
- Figura 34- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: 30 minutos; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25 °C. Conc.: 1,25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2. 81
- Figura 35- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos; NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25 °C. Conc.: 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2. 81
- Figura 36- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25 °C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2. 82
- Figura 37- Efeito da variação do pH na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25 °C, NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25 °C. Conc.: 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2. 83
- Figura 38- Efeito da variação do pH na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos a 25 °C, NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25 °C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2. 83
- Figura 39- Efeito do solvente de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Extração: 40 minutos; NaCl: 10% (m/v), NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. Conc. HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹, n = 3. 87
- Figura 40- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Solvente de extração: 1-octanol, NaCl: 10% (m/v), NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. Conc.: HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹, n = 3. 88
- Figura 41- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Solvente de extração: 1-octanol, tempo de extração 40 minutos, NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹, n = 3. 89
- Figura 42- Teste de racemização dos estereoisômeros do IBU durante a SPME. Cromatograma (A) representa urina fortificada com (-)-(R)-IBU (1) e (B) urina fortificada com (+)-(S)-IBU (2). Coluna Chiralpak AD-RH[®]; Fase móvel: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 1 mol L⁻¹ (75:25, v/v); vazão: 0,45 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 105
- Figura 43- Teste de racemização dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU durante a SPME. Cromatograma A representa urina fortificada com (+)-(S)-IBUOH (1), B com (-)-(R)-IBUOH (2), C com (2'S,2S)-IBUCOOH (3), D com (2'R,2S)-IBUCOOH (4), E com (2'S,2R)-IBUCOOH (5) e F com (2'R,2R)-IBUCOOH (6). Coluna Chiralpak AS[®]; Fase móvel: hexano : isopropanol (95:5 v/v) + 0,05% de TFA; vazão: 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 105
- Figura 44- Teste de racemização dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos durante a SPME. Cromatograma A representa urina fortificada com (-)-(R)-DCQ (1), B com (+)-(S)-DCQ (2), C com (-)-(R)-HCQ, (3), D (+)-(S)-HCQ (4), E (-)-(R)-DHCQ (5) e F com (+)-(S)-DHCQ (6). Coluna Chiralcel OD-H[®]; Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2 v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min⁻¹; detecção em 343 nm. 106
- Figura 45- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 200 mg de IBU. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 2-4 horas. (-)-(R)-IBU (1) e (+)-(S)-IBU (2). Fase móvel: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 1 mol L⁻¹ (75 : 25, v/v); vazão: 0,45 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 107
- Figura 46- Gráfico da concentração urinária *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina de um voluntário, após dose oral única de 200 mg de IBU 107

Figura 47- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 200 mg de IBU. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 4-6 horas. (+)-(S)-2-IBUOH (1), (-)-(R)-2-IBUOH (2), (2`S,2S)-IBUCOOH (3), (2`R,2S)-IBUCOOH (4), (2`S,2R)-IBUCOOH (5), (2`R,2R)-IBUCOOH (6), Coluna Chiralpak AS[®]. Fase móvel: hexano : isopropanol (95 : 5, v/v) + 0,05% TFA; vazão: 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 108

Figura 48- Gráfico da quantidade excretada acumulada *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina de um voluntário, após dose oral única de 200 mg de IBU. 108

Figura 49- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 400 mg de HCQ. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 12-16 horas. 1-rac-mirtazapina, 2-(-)-(R)-DCQ, 3-(+)-(S)-DCQ, 4-(-)-(R)-HCQ, 5-(+)-(S)-HCQ e 7-(+)-(S)-DHCQ. Coluna Chiralcel OD-H[®]. Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min⁻¹; detecção em 343 nm. 109

Figura 50- Gráfico da quantidade excretada acumulada *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina por SPME-HPLC de um voluntário, após dose oral única de 400 mg de HCQ. 110

Figura 51- Eletroferogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 400 mg de HCQ. Eletroferograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) em 2 comprimentos de onda e eletroferograma (B), tempo de coleta entre 12-16 horas. 1-(-)-(R)-HCQ, 2-(+)-(S)-HCQ 3-(-)-(R)-DHCQ, 4-(+)-(S)-DHCQ, 5-(-)-(R)-DCQ, 6-(+)-(S)-DCQ and 7-(+)-(S)-BDCQ, detecção em 343 nm. Condições de análise descrito na Figura 23. 110

Figura 52- Gráfico da quantidade excretada acumulada *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina por LPME-CE de um voluntário, após dose oral única de 400 mg de HCQ. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Disposição cinética e efeitos farmacológicos estereosseletivos de alguns fármacos quirais	2
Tabela 2- Principais colunas quirais baseadas em polissacarídeos (http://www.daicelchiral.com/appguide/index/column_table.htm . Acessado em 18 de Abril de 2007)	5
Tabela 3- Proteínas utilizadas em FEQs (Haginaka, 2001)	6
Tabela 4- Propriedades químicas dos antibióticos da classe dos glicopeptídeos (Ward, Farris III, 2001)	8
Tabela 5- Fibras de SPME disponíveis comercialmente (Supelco, 1999).	25
Tabela 6- Comparação dos resultados obtidos com as colunas Chiralpak AD [®] e Chiralpak AS [®]	65
Tabela 7- Comparação dos resultados obtidos com as colunas Chiralpak AD-RH [®] , Chiralcel OJ-R [®] e Chiralcel OJ [®]	66
Tabela 8- Valores de R para separação da HCQ e seus principais metabólitos	66
Tabela 9- Eficiência de extração da HCQ e seus metabólitos utilizando diferentes fases aceptoras	90
Tabela 10- Eficiência de extração da HCQ e seus metabólitos utilizando diferentes fases doadoras	90
Tabela 11- Recuperação e linearidade do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC	93
Tabela 12- Recuperação e linearidade do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC	93
Tabela 13- Recuperação e linearidade do método para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE	93
Tabela 14- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 10) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC	97
Tabela 15- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC	97
Tabela 16- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 5) do método para análise da HCQ e seus metabólitos por CE.	97
Tabela 17- Precisão e exatidão interensaio (n = 5) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC	98
Tabela 18- Precisão e exatidão interensaio (n = 5 para cada concentração) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC	98
Tabela 19- Precisão e exatidão interensaio (n = 5 para cada concentração) do método para análise da HCQ e seus metabólitos por CE.	98

Tabela 20 - Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC	99
Tabela 21- Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC	99
Tabela 22- Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE	99
Tabela 23- Avaliação da capacidade de interferência de alguns fármacos nos métodos de análise do IBU e de seus metabólitos	101
Tabela 24- Avaliação da interferência de algumas drogas na análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC	101
Tabela 25-Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise da HCQ e seus metabólitos por CE.	102
Tabela 26- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	103
Tabela 27- Estabilidade no tempo e condições de análise	104
Tabela 28- Comparação entre os métodos descritos para análise enantiosseletiva do IBU e de seus metabólitos em urina	113
Tabela 29- Comparação entre os métodos descritos para análise enantiosseletiva da HCQ e de seus metabólitos em urina	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Procedimento de lavagem do capilar nas análises por CE	69
Quadro 2- Condições para análise do IBU por SPME	85
Quadro 3- Condições para análise dos metabólitos do IBU por SPME	85
Quadro 4- Condições para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME	85
Quadro 5- Condições estabelecidas para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BDCQ	Bisdesetilcloroquina
CD	Ciclodextrina
C_f	Concentração do analito na fibra no equilíbrio
C_m	Concentração do analito na matriz aquosa no equilíbrio
C_s	Concentração de sal
CE	Eletroforese capilar
CD	Ciclodextrina
CEC	Eletrocromatografia capilar
CIEF	Eletroforese capilar de focalização isoelétrica
CGE	Eletroforese capilar em gel
CV	Coeficiente de variação
CAR-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano
CW-DVB	Carbowax-divinilbenzeno
CW-TPR	Carbowax-templated resin
CYP	Citocromo P 450
d	Diâmetro interno da coluna
DCQ	Desetilcloroquina
DEA	Dietilamina
DVB-CAR-PDMS	Divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano
DHCQ	Desetilhidroxicloroquina
IBUCOOH	Carboxiibuprofeno
D_w	Coeficiente de difusão do analito na matriz
FEQ	Fase estacionária quiral
FDA	“Food and Drug Administration”
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre

GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HCQ	Hidroxicloroquina
ICH	“International Conference on Harmonization”
2-IBUOH	2-Hidroxiibuprofeno
k	Fator de retenção
K^{fw}	Constante de equilíbrio líquido-líquido
L	Comprimento da coluna
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida
ME	Extração em membrana
MECK	Cromatografia eletrocínética micelar
n_s	Quantidade de analito extraída
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
P.I	Ponto isoelétrico
pKa	-log da constante de acidez
r	Coeficiente de correlação
r_o	Raio externo da fibra
r_i	Raio interno da fibra
R_s	Resolução
SPME	Microextração em fase sólida
S	Estimativa de desvio padrão
SPE	Extração em fase sólida
t_0	Tempo inicial
t_e	Tempo de equilíbrio

TFA	Ácido trifluoracético
t_m	Tempo de migração
TP	Tampão de análise
t_R	Tempo de retenção
V	Vazão da fase móvel
V_c	Volume da coluna vazia
V_{aq}	Volume da matriz
V_s	Volume do polímero
w_b	Largura da base dos picos
α	Fator de separação
δ	Camada estática formada ao redor da fibra
ΔG^{fw}	Entalpia de transferência do analito na matriz

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	ix
Lista de quadros	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fármacos quirais	1
1.2 Resolução de Enantiômeros por HPLC	2
1.2.1 Fases estacionárias quirais	3
1.2.1.1 Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos	4
1.2.1.2 Fases estacionárias derivadas de proteínas	6
1.2.1.3 Fases estacionárias derivadas de antibióticos macrocíclicos	7
1.3 Eletroforese capilar	7
1.3.1 Fluxo eletroforético	9
1.3.2 Fluxo eletroosmótico	10
1.3.3 Análise enantiosseletiva por CE	12
1.3.4 Ciclodextrinas e derivados	13
1.4 Preparação de amostras	15
1.4.1 Extração em membrana	16
1.4.1.1 Microextração em fase líquida (LPME) utilizando membranas cilíndricas	17
1.4.2 Microextração em fase sólida (SPME)	23
1.4.2.1 Extração	25
1.4.2.2 Dessorção	26
1.5 Fármacos selecionados	28
1.5.1 Ibuprofeno	28

1.5.1.1 Revisão da literatura	28
1.5.1.2 Análise enantiosseletiva do ibuprofeno de seus principais metabólitos em urina	31
1.5.2 Hidroxicloroquina	32
1.5.2.1 Revisão da literatura	32
1.5.2.2 Análise enantiosseletiva da HCQ e seus metabólitos em fluidos biológicos	35
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais	40
3.1.1 Equipamentos e acessórios	40
3.1.2 Reagentes e solventes	41
3.1.3 Colunas quirais, coluna de guarda e capilar	42
3.1.4 Soluções-padrão do IBU e seus metabólitos	43
3.1.5 Soluções-padrão de HCQ e seus metabólitos	44
3.1.6 Amostras de urina	44
3.2 Métodos	44
3.2.1 Preparação das fases móveis	44
3.2.1.1 Modo fase reversa	44
3.2.1.2 Modo fase normal	45
3.2.2 Preparação das soluções tampão	45
3.2.3 Avaliação da separação quiral por HPLC	45
3.2.4 Separação quiral da HCQ e seus metabólitos por CE	46
3.2.5 Ordem de eluição dos estereoisômeros do IBU, 2-IBUOH e IBUCOOH	46
3.2.6 Ordem de eluição dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos	47
3.2.7 Procedimento de preparação da amostra para análise do IBU e seus principais metabólitos	47
3.2.7.1 Otimização das condições de SPME para determinação total do ibuprofeno e de seus metabólitos (livre + conjugado)	47

3.2.8 Procedimento de preparação da amostra para análise da HCQ e seus metabólitos	49
3.2.8.1 Otimização das condições de SPME para determinação da HCQ e seus principais metabólitos por HPLC	49
3.2.8.2 Otimização das condições de LPME para determinação da HCQ e seus metabólitos por CE	50
3.2.9 Validação	51
3.2.9.1 Curva analítica e linearidade	52
3.2.9.2 Recuperação	52
3.2.9.3 Precisão e exatidão	53
3.2.9.3.1 Precisão e exatidão intra-ensaio	54
3.2.9.3.2 Precisão e exatidão interensaios	54
3.2.9.4 Limite de quantificação	55
3.2.9.5 Seletividade	55
3.2.9.6 Estabilidade	55
3.2.9.6.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	55
3.2.9.6.2 Estabilidade no tempo e condições de análise	56
3.2.9.7 Teste de racemização	56
3.2.10 Aplicação do método	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Otimização da separação dos enantiômeros	58
4.1.1 Avaliação das colunas quirais	58
4.1.1.1 Coluna Chiralcel OD-H	58
4.1.1.2 Coluna Chiralpak AD	59
4.1.1.3 Coluna Chiralpak AS	60
4.1.1.4 Coluna Chiralcel OJ	61
4.1.1.5 Coluna Chiralcel OG	62
4.1.1.6 Coluna Chiralpak AD-RH	62
4.1.1.7 Coluna Chiralcel OJ-R	64

4.1.1.8 Comparação das colunas quirais	64
4.1.1.9 Alteração na constituição da fase móvel para análise do IBU	66
4.1.1.10 Ordem de eluição dos estereoisômeros do IBU e de seus metabólitos	67
4.1.1.11 Ordem de eluição dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos	68
4.1.2 Separação dos estereoisômeros da HCQ e metabólitos por CE	68
4.2 Análise enantiosseletiva do IBU e seus metabólitos e da HCQ e seus principais metabólitos em urina empregando SPME	70
4.2.1 Otimização das condições de SPME	70
4.2.1.1 Escolha da fibra de extração	70
4.2.1.2 Tempo de extração	74
4.2.1.3 Adição de cloreto de sódio	77
4.2.1.4 Temperatura de extração	79
4.2.1.5 Controle do pH	82
4.2.1.6 Período de dessorção e “carryover”	84
4.2.2 Condições otimizadas da SPME	84
4.3 Análise enantiosseletiva da HCQ e seus principais metabólitos em urina empregando LPME	86
4.3.1 Otimização das condições de LPME	86
4.3.1.1 Tipo de solvente de extração	86
4.3.1.2 Tempo de extração	87
4.3.1.3 Adição de sal	88
4.3.1.4 Composição da fase aceptora e fase doadora	89
4.3.2 Condições otimizadas da LPME	91
4.4 Validação	91
4.4.1 Linearidade	92
4.4.2 Recuperação	94
4.4.3 Precisão e exatidão	95
4.4.4 Limite de quantificação	96

4.4.5 Seletividade/Especificidade	100
4.4.6 Estabilidade	102
4.4.7 Racemização	104
4.5 Aplicação do método	106
4.6 Comparação com outros métodos da literatura	111
5 CONCLUSÕES	114
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	

1- INTRODUÇÃO

1.1- FÁRMACOS QUIRAIS

A natureza quiral dos organismos vivos tem implicações evidentes e importantes nas interações com compostos biologicamente ativos. Ao nível molecular, a quiralidade representa uma propriedade intrínseca das substâncias que compõe nosso organismo, tais como amino ácidos, açúcares, peptídeos, proteínas e polissacarídeos. Como consequência, processos metabólicos e regulatórios mediados pelos sistemas biológicos são sensíveis a estereoquímica e, respostas diferentes podem ser observadas quando as atividades de um par de estereoisômeros são comparadas. Esterosseletividade é freqüentemente uma característica típica de reações enzimáticas, interações entre mensageiros e receptores e processos metabólicos (WAINER, 1993; ABOUL-ENEIN; WAINER, 1997).

A ação de fármacos é o resultado de processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, pelos quais eles entram, interagem e deixam o organismo. Existem vários exemplos de fármacos que mostram diferenças em termos de ação farmacológica como consequência de processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos estereosseletivos (biodisponibilidade, distribuição, comportamento metabólico e excreção) (Tabela 1) (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Até o começo da década de 90, a comercialização de fármacos enantiomericamente puros era um desafio com muitas limitações práticas (LEE; WILLIAMS, 1990), embora as indústrias farmacêuticas estivessem sendo encorajadas pelas autoridades para desenvolvê-los. Atualmente, a situação vem mudando com os avanços nas técnicas que permitem a produção de muitos estereoisômeros puros em escala comercial, como técnicas de síntese assimétrica e técnicas de separação preparativas como “simulated moving bed” e “closed-loop steady state recycling” (GUIOCHON, 2002). Com esses avanços, autoridades regulatórias como o FDA, nos Estados Unidos têm definido requerimentos mais rígidos para a liberação de novos fármacos, como a necessidade de documentação completa do perfil

farmacológico e farmacocinético dos estereoisômeros puros, assim como sua combinação (ABOUL-ENEIN; WAINER, 1997; CALDWELL, 1995a, 1995b; SHINDO; CALDWELL, 1991; BLUMENSTEIN, 1997).

Tabela 1- Disposição cinética e efeitos farmacológicos estereosseletivos de alguns fármacos quirais.

Fármaco Quiral	Diferenças Farmacocinéticas ou Farmacodinâmicas dos Estereoisômeros
Ketamina	O estereoisômero-(+)-(S) é responsável pelo efeito anestésico enquanto o (-)-(R)-estereoisômero é responsável pelos efeitos psicoativos indesejáveis (WHITE et al., 1980).
Praziquantel	A atividade anti-helmíntica é associada principalmente ao (-)-(R)-estereoisômero, que também é preferencialmente metabolizado (ANDREWS, 1985).
Propranolol	A forma enantiomérica (+)-(S)- é mais potente que a (-)-(R)-, e o estereoisômero (+)-(S)- apresenta tempo de meia-vida mais longo que o estereoisômero (-)-(R)- (EGGINGER et al., 1994).
Salbutamol	A forma enantiomérica (R)- é responsável pelo efeito broncodilatador do fármaco (NOWAK, 2003)
Omeprazol	Diferenças metabólicas entre os estereoisômeros. Para o (+)-(R)-omeprazol, a principal rota do metabolismo é a hidroxilação através da CYP2C19 enquanto que para o (-)-(S)-estereoisômero, a principal rota é a sulfonação pela CYP3A4 (CEDERBERG; ANDERSSON; SKÅNBERG, 1989).

Para realizar o estudo das propriedades e possíveis diferenças farmacocinéticas dos estereoisômeros, os mesmos precisam ser separados e quantificados em fluídos biológicos por técnicas analíticas especiais, já que apresentam as mesmas propriedades físicas e químicas. Dessa maneira, as técnicas de separação de compostos quirais são operacionalmente mais caras e complicadas que as convencionais. As principais técnicas quirais cromatográficas utilizadas na separação de estereoisômeros são a cromatografia gasosa, cromatografia por fluido super crítico, eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KERN; KIRKLAND, 1997).

1.2- RESOLUÇÃO DE ESTEREOISÔMEROS POR HPLC

Atualmente, HPLC é a técnica mais utilizada para a resolução de estereoisômeros devido à sua versatilidade, robustez e facilidade operacional. A resolução de estereoisômeros por HPLC pode ser conseguida empregando-se métodos diretos ou indiretos.

A maioria das primeiras separações de estereoisômeros reportadas na literatura foram baseadas em métodos indiretos de separação. Nesse caso, ocorre a reação do composto quiral de interesse (amostra) com um reagente de derivação quiral e enantiomericamente puro. O produto dessa reação gera dois diastereoisômeros, um para cada estereoisômero presente na amostra inicial, que agora são separados por HPLC convencional. Esse método apresenta como desvantagens a necessidade de reagentes quirais com alto grau de pureza e, muitas vezes, o tempo para que ocorra a reação completa entre o reagente e a amostra torna o método muito demorado (HAGINAKA, 2002).

O método direto de separação é baseado na formação de complexos diastereoisoméricos na própria fase estacionária, formada por moléculas opticamente ativas, ou na fase móvel, com a adição de aditivos quirais. O uso de fase móvel quiral é pouco empregado pois os aditivos quirais apresentam um alto custo, podem gerar dificuldades na detecção dos analitos, etc. (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A separação baseada na formação de complexos diastereoisoméricos na própria fase estacionária é mais simples e reprodutível já que os polímeros opticamente ativos estão aderidos sobre um suporte (normalmente de sílica) que confere uma grande resistência química e mecânica a essas fases.

1.2.1- FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS (FEQs)

As FEQs são em sua maioria constituídas de um suporte, normalmente partículas de sílica ou sílica-aminopropil, no qual são incorporados os diversos seletos quirais (KERN; KIRKLAND, 1997). As FEQs que são freqüentemente utilizadas na resolução de enantiômeros são as baseadas em polissacarídeos, em proteínas e antibióticos macrocíclicos.

1.2.1.1- FASES ESTACIONÁRIAS DERIVADAS DE POLISSACARÍDEOS

Essas fases estacionárias quirais são baseadas em derivados de polissacarídeos, principalmente amilose e celulose. Os polissacarídeos *in natura* não são muito úteis para serem usados como fase estacionária quiral, devido a suas limitadas propriedades enantiosseletivas (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). Contudo, quando suas moléculas são modificadas, seu poder de resolução torna-se bastante eficiente. A tabela 2 mostra diversas FEQs derivadas de polissacarídeos. O mecanismo de interação quiral depende muito dos substituintes presentes nas moléculas desses polissacarídeos. Os principais tipos de interações que podem ocorrer entre o soluto e a fase estacionária são interações polares, como ligações de hidrogênio, interações π - π e interações dipolo-dipolo (YASHIMA; OKAMOTO, 1995). O encaixe dos enantiômeros nas hélices dos polissacarídeos também tem um papel importante no mecanismo de separação quiral (ARAI, 1998).

Essas fases estacionárias podem ser empregadas nos modos de eluição normal, reverso e polar-orgânico, possibilitando a separação de uma ampla variedade de compostos quirais, tanto em escala analítica como preparativa (OKAMOTO; KAIDA, 1994; TACHIBANA; OHNISHI, 2001; OKAMOTO; YASHIMA, 1998).

No modo normal, uma mistura de hexano e 2-propanol ou etanol é freqüentemente utilizada como fase móvel. O tipo de álcool pode influenciar a enantiosseletividade (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). Quando analitos possuem grupamentos ácidos ou básicos, a adição de pequenas quantidades de um ácido (ácido trifluoracético, TFA) ou de uma base (dietilamina, DEA) (OKAMOTO; YASHIMA, 1998) pode melhorar a separação desses fármacos, respectivamente. Porém, nem sempre essa relação é verdadeira e a separação de moléculas com caráter básico também tem sido realizada com a adição de TFA na fase móvel. Um exemplo é a separação dos estereoisômeros de compostos com grupamentos amina secundários distantes do centro quiral, por exemplo, o salbutamol na coluna Chiralcel OJ (BARTOLINIC et al., 2005); a enantiosseletividade é aumentada quando o TFA é adicionado à fase móvel constituída por hexano e etanol. O ácido presente na fase móvel deve formar um par iônico com o analito básico e assim melhorar a separação. É possível

também que o ácido possa mascarar os grupos silanóis presentes na fase estacionária e diminuir as interações não-quirais com o analito (BARTOLINIC et al., 2005).

Tabela 2- Principais colunas quirais baseadas em polissacarídeos (http://www.daicelchiral.com/appguide/index/column_table.htm. Acessado em 18 de Abril de 2007).

Derivados de Polissacarídeo	Nome Comercial
Celulose microcristalina triacetato	Chiralcel CA-1 / Cellulose triacetate / Cellulose Cel-AC-40XF
Celulose triacetato	Chiralcel OA
Celulose tribenzoato	Chiralcel OB / Chiralcel OB-H
Celulose trisfenilcarbamato	Chiralcel OC
Celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	Chiralcel OD / Chiralcel OD-H / Chiralcel OD-R
Celulose tris (4-clorofenilcarbamato)	Chiralcel OF
Celulose tris (4-metilfenilcarbamato)	Chiralcel OG
Celulose tris (4-metilbenzoato)	Chiralcel OJ / Chiralcel OJ-H / Chiralcel OJ-RH
Celulose tricinamato	Chiralcel OK
Amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	Chiralpak AD / Chiralpak AD-H / Chiralpak AD-RH
Amilose tris [(S)-1-feniletilcarbamato]	Chiralpak AS / Chiralpak AS-H / Chiralpak AS-R

No modo reverso, os eluentes utilizados são principalmente soluções aquosas e modificadores orgânicos miscíveis. Os modificadores orgânicos mais empregados são a acetonitrila ou metanol, pois apresentam baixa viscosidade e baixa absorção no UV (TACHIBANA; OHNISHI, 2001). O uso de soluções tampão também deve ser considerado quando se deseja controlar o pH da fase móvel. Já no modo polar-orgânico, as fases móveis empregadas são compostas por solventes orgânicos polares puros ou misturas, sendo estes: acetonitrila, metanol, etanol, propanol (TACHIBANA; OHNISHI, 2001). Esse modo pode ser atraente para separações em escalas preparativas, pois torna possível a reciclagem do solvente, quando usado puro.

1.2.1.2- FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE PROTEÍNAS

As proteínas e glicoproteínas, respectivamente, consistem de amino ácidos e amino ácidos e açúcares, sendo ambos quirais. Assim, todas as proteínas têm habilidade de discriminar moléculas quirais (HAGINAKA, 2001). Contudo, somente um número limitado de proteínas vem sendo usado no desenvolvimento de FEQs (Tabela 3). As FEQs baseadas em proteínas são de especial interesse devido à suas propriedades enantiosseletivas intrínsecas, o que as torna adequadas para a separação de uma grande variedade de analitos (HAGINAKA, 2001).

As vantagens das FEQs baseadas em proteínas geralmente incluem a possibilidade do uso de fase móvel aquosa, enantiosseletividade para um grande número de compostos e a análise direta sem a necessidade de derivação quiral. Entre as desvantagens, destaca-se a falta de robustez, o limitado entendimento dos mecanismos de reconhecimento quiral e a baixa capacidade das colunas, que geralmente não são usadas em separações em escala preparativa (HAGINAKA, 2001).

Tabela 3- Proteínas utilizadas em FEQs (HAGINAKA, 2001).

Proteína	Porcentagem de carboidrato	Origem
Albuminas		
Soroalbumina bovina (BSA)		Soro bovino
Soroalbumina humana (HSA)		Soro humano
Glicoproteínas		
α_1 -glicoproteína ácida (AGP)	45	Soro humano e bovino
Ovomucóide	30	Clara de ovo
Ovoglicoproteína	25	Clara de ovo
Avidin	7	Clara de ovo
Proteína ligante de riboflavina	14	Clara de ovo
Enzimas		
Celobiohidrolase	6	Fungo
Lisozima		Clara de ovo
Pepsina		Estômago de Porcos
Amiloglicosidase	10-35	Fungo
Outras		
Ovotransferrina	2,6	Clara de ovo
β -Lactoglobulina		Leite bovino

1.2.1.3- FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ANTIBIÓTICOS MACROCÍCLICOS

Os antibióticos macrocíclicos possuem diversas características que permitem a eles interagirem estereosseletivamente com analitos de diversas formas (Tabela 4). Eles têm um elevado número de centros estereogênicos e grupos funcionais, o que permite múltiplas interações com analitos quirais (WARD; FARRIS III, 2003), através de interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo, π - π , ligações de hidrogênio, repulsão estérea (ARMSTRONG; NAIR, 1997) e, principalmente, interação iônica (GASPER et al., 1996). Além das porções hidrofóbicas, essas moléculas possuem grupos hidrofílicos assim como diversos grupos ionizáveis, conferindo boa solubilidade em meio aquoso. Os antibióticos macrocíclicos podem ser ácidos, básicos ou neutros e podem ter pouca ou nenhuma absorbância no UV – Vis. FEQs composta pelos antibióticos macrocíclicos vancomicina, teicoplanina, ristocetina A, avoparcina, rifamicina B e tiostreptona vêm sendo bastante usadas em separações quirais por HPLC. Os antibióticos baseados em glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina, ristocetina A e avoparcina) parecem ter uma capacidade enantiosseletiva maior que as ansamicinas ou tiostreptona. As FEQs derivadas de antibióticos glicopeptídeos podem ser usadas nos modos de eluição normal, polar-orgânico e reverso (ARMSTRONG et al., 1994; ARMSTRONG; LIU; EKBORG-OTT, 1995). As colunas com essas FEQs exibem boa estabilidade mecânica, apresentam preços compatíveis com as outras FEQs, podem ser usadas para fins preparativos e, ao contrário das FEQs derivadas de proteínas, quando utilizadas em modo normal, a presença de hexano na fase móvel não causa qualquer tipo de desnaturação ou mudanças irreversíveis (WARD; FARRIS III, 2001).

1.3- ELETROFORESE CAPILAR (CE)

Eletroforese é a migração de íons em solução sob a influência de um campo elétrico. Na CE, um diferencial de potencial elétrico separa os componentes de uma solução dentro de um tubo capilar de sílica fundida com diâmetro interno e comprimento variável (HARRIS,

2005). Os principais componentes de um equipamento para CE (Figura 1) são: uma fonte de alta tensão, um capilar que passa através de um sistema de detecção conectado a um receptor de dados e um sistema automatizado de introdução da amostra (ALTRIA, 1996).

Tabela 4- Propriedades químicas dos antibióticos macrocíclicos da classe dos glicopeptídeos (WARD; FARRIS III, 2001).

Propriedades	Ristocetina A	Teicoplanina	Vancomicina	Tiostreptona
Massa molecular	2066	1877	1449	1665
n. de centro estereogênico	38	23	18	17
n. de macrocíclos	4	4	3	2
n. de moléculas de açúcar	6	3	2	0
n. de anéis aromáticos	7	7	5	2
n. de grupos hidroxilas	21	15	9	5
n. de amidas ligadas	6	7	7	10
n. de grupos aminas	2	1	2	1
n. de aminas secundárias	0	0	1	1
p.I	7,5	4,2; 6,5	7,2	Não informado
Produzido por	<i>Nocardia Lurida</i>	<i>Actinoplanes teicomyceticus</i>	<i>Streptomyces orientalis</i>	<i>Streptomyces azureus</i>

Normalmente o equipamento de CE é completamente controlado por um computador. Inicialmente, o capilar é preenchido com uma solução tampão. Uma alíquota da amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar (usualmente o ânodo). As pontas dos capilares são então mergulhadas em 2 reservatórios contendo os eletrodos e o tampão de análise. A aplicação de tensão através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos, resultando no deslocamento das espécies no capilar. A detecção é feita “on-line” no próprio capilar, freqüentemente por UV (Figura 1) ou “off line” como, por exemplo, quando a CE é acoplada a um espectrômetro de massas. O gráfico gerado é chamado de eletroferograma (ALTRIA, 1996). A CE pode ser realizada em diferentes mecanismos de separação, sendo que os mais utilizados são a cromatografia eletrocínética micelar (MECK), a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), eletroforese capilar em gel (CGE),

eletroforese capilar de focalização isoeletrica (CIEF) e eletrocromatografia capilar (CEC) (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1992). Nesse estudo, a FSCE foi utilizada como modo de separação. Esse modo é caracterizado por uma eletroforese de alta tensão em solução livre, onde a separação se fundamenta na mobilidade eletroforética da espécie e no fluxo eletrosmótico. Se a parede do capilar é negativa, o fluxo eletrosmótico é na direção do cátodo e a ordem de migração será cátions, espécies neutras e ânions. Se a carga é invertida, a ordem de migração será ânions, neutras e cátions (HARRIS, 2005).

Figura 1- Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (HARRIS, 2005)

1.3.1- FLUXO ELETROFORÉTICO (FE)

FE é o movimento de íons da amostra sob a influência de uma tensão aplicada. Os íons se movem no sentido do eletrodo apropriado e passando pelo detector. A taxa de migração ou mobilidade do íon é governada pelo seu tamanho e número de cargas. Assim, um íon pequeno se moverá mais rapidamente que um íon maior com o mesmo número de cargas. A mobilidade eletroforética (μE) é, portanto, relacionada à proporção carga/massa, de acordo com a seguinte equação (ALTRIA, 1996):

$$\mu E = (q/6\pi\eta) r$$

Onde μE é a mobilidade eletroforética, q é o número de cargas, η é a viscosidade da solução e r é o raio do íon. A velocidade eletroforética (V) é relacionada com as mobilidades dos íons e a magnitude da tensão aplicada (E), de acordo com a equação descrita abaixo (ALTRIA, 1996):

$$V = \mu E.E$$

Assim, quanto maior a tensão aplicada, mais rapidamente o íon se deslocará no interior do capilar.

1.3.2- FLUXO ELETROSMÓTICO (EOF)

A parede interna de um capilar de sílica fundida é constituída por grupos silanóis (Si-OH) com carga negativa em pH acima de 2 (Si-O⁻). Uma camada de cátions imóveis e fortemente adsorvidos, adjacentes à superfície, neutraliza parcialmente a carga negativa (Figura 2A). A carga negativa restante é neutralizada pelo excesso de cátions móveis solvatados na parte difusa da dupla camada, localizada na solução próxima à parede. A espessura da parte difusa da dupla camada se situa na faixa próxima a 10 nm quando a força iônica do meio é 1 mmol L⁻¹, e 0,3 nm quando a força iônica é 1 mol L⁻¹ (HARRIS, 2005). Na presença de um campo elétrico, os cátions são atraídos para o cátodo e os ânions para o ânodo (Figura 2B). O excesso de cátions na parte difusa da dupla camada transfere o movimento resultante na direção do cátodo. Esta ação de bombeamento, chamada eletrosmose, é produzida pelos cátions solvatados na região de 10 nm em relação as paredes e cria um fluxo eletrosmótico uniforme da solução inteira na direção do cátodo (Figura 3A). Este comportamento contrasta com o de um fluxo hidrodinâmico produzido por uma diferença de pressão entre as extremidades de um capilar. No fluxo hidrodinâmico, o perfil de velocidade ao longo de uma secção transversal do fluido é parabólico, ou seja, é mais rápido no centro e é praticamente nulo próximo as paredes (Figura 3B). Esse perfil de fluxo hidrodinâmico é observado em separações por HPLC. A constante de

proporcionalidade entre a velocidade eletrosmótica (u_{eo}) e o campo aplicado (E) é chamado de mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}) (HARRIS, 2005):

$$u_{eo} = \mu_{eo}E$$

A mobilidade eletrosmótica é diretamente proporcional à densidade de carga na superfície da sílica e inversamente proporcional à raiz quadrada da força iônica do meio. A eletrosmose diminui em pH baixo e em força iônica alta. O fluxo eletrosmótico uniforme contribui para o alto poder de resolução da eletroforese capilar. Qualquer efeito que diminua a uniformidade cria um alargamento da banda e diminui a resolução.

Figura 2- Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico (HARRIS, 2005).

A presença do EOF permite a separação e detecção de cátions e ânions em uma única análise, já que o EOF é suficientemente forte em pH 7 e acima, para levar os ânions para o cátodo e, assim, serem detectados. Ânions pequenos ou com múltiplas cargas são mais difíceis de serem arrastados pelo EOF e, portanto, serão detectados mais tardiamente (ALTRIA, 1996).

Figura 3- Perfil de fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (fluxo laminar) (B) (HARRIS, 2005).

1.3.3- ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA POR CE

A grande eficiência apresentada em separações por CE (100.000 – 200.000 pratos em um capilar típico) faz esta técnica atraente para ser utilizada em separações de moléculas quirais (WANG, WARNER, 1994). Dentre as vantagens do uso de CE em separações quirais, destaca-se (BLANCO; VALVERDE, 2003):

- ⇒ Possibilidade de alterar facilmente a natureza e a concentração do seletor quiral;
- ⇒ Possibilidade de uso de diversos seletos quirais em combinação para melhorar a separação;
- ⇒ Baixo consumo de amostra e reagentes, o que permite o uso de seletos quirais mais caros, e;
- ⇒ Excelente eficiência e rapidez na separação.

Usualmente, a separação quiral por CE é realizada através da adição de seletos quirais no tampão de análise. Para ser efetivo, o seletor quiral deve ter diversas características, entre elas (BLANCO; VALVERDE, 2003):

- ⇒ Deve ser estereosseletivo e formar complexos diastereoisoméricos transitórios com os estereoisômeros;
- ⇒ Deve ser solúvel e quimicamente estável no tampão de análise;
- ⇒ Não deve interferir na detecção, e;
- ⇒ Possuir uma cinética de complexação rápida.

Diversas substâncias são utilizadas como seletos quirais em CE, entre elas, ciclodextrinas e derivados, éteres de coroa quirais, antibióticos macrocíclicos, surfactantes quirais, complexos de troca de ligantes e polissacarídeos de cadeia linear (BLANCO; VALVERDE, 2003). Nesse estudo, somente ciclodextrinas e seus derivados foram utilizados.

1.3.4-CICLODEXTRINAS (CDs) E DERIVADOS

CDs são olissacarídeos que ocorrem naturalmente na natureza. Compreendem a α , β e γ CD e são formadas respectivamente por seis, sete e oito unidades de glicopirranose. As CDs têm o formato de um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica e parte externa hidrofílica devido a presença de grupamentos hidroxilas nas aberturas do cone truncado (BLANCO; VALVERDE, 2003). O mecanismo aceito de enantioresolução com as CDs envolve a inclusão do analito quiral na sua cavidade e a participação de interações secundárias com grupamentos hidroxilas, formando assim um complexo de inclusão. Essas interações diferem entre os estereoisômeros e são responsáveis pelas diferenças nas constantes de formação dos complexos de inclusão (BLANCO; VALVERDE, 2003). O analito formará complexo de inclusão com a CD somente se a molécula ou pelo menos uma parte dela se encaixar na sua cavidade, embora a inclusão não assegure a enantioseparação. As cavidades das CDs naturais podem ser preenchidas por diversos compostos, particularmente se eles possuem anéis aromáticos. Analitos com um anel aromático podem formar complexos de inclusão com α -CD, que possui a menor cavidade. Exemplos de analitos que formam esse tipo de complexo são o hexobarbital (MAYER; SCHÜRIG, 1994) e a aminoglutetimida (ANIGBOGU; COPPER; SEPANIAK, 1995). β -CD é a CD natural com o maior poder de enantioresolução. De fato, analitos com 2 anéis aromáticos substituídos se encaixam nessa cavidade. Exemplos de compostos com dois anéis aromáticos substituídos que tem sido resolvidos com essas CDs são os ácidos arilpropionicos (RAWJEE; STAERK; VIGH, 1993) e as catecolaminas (QUANG; KHALEDI,

1995). γ -CD é mais adequada para a resolução de analitos com 3 anéis aromáticos. Anéis aromáticos substituídos que exibem impedimento estéreo dificultando a resolução com a β -CD, podem ser melhor resolvidos com esta CD.

Apesar das diversas aplicações que existem com essas CDs naturais, seu uso não é muito amplo devido a baixa capacidade enantiosseletiva (EASTON; LINCOLN, 1996). Modificações nessas CDs têm levado a um aumento na discriminação quiral com um aumento no grau de assimetria. Modificações nessas ciclodextrinas podem dar origem a derivados neutros e carregados. As CDs neutras modificadas são obtidas pela troca de grupos hidroxilas por alquilas, o que aumenta a solubilidade e flexibilidade das CDs. Esses dois fatores ajudam a acomodar melhor o analito e aumentar a estabilidade do complexo resultante (EASTON; LINCOLN, 1996), melhorando a capacidade de enantioresolução. Isso se reflete no extensivo uso dos derivados metílicos, como a heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -CD (TM- β -CD) e heptakis (2,6-di-O-metil)- β -CD (DM- β -CD) (GÜBITZ; SCHMID, 1997). A influência do tamanho da cavidade das CDs foi também examinada comparando a TM- α -CD, TM- β -CD e a TM- γ -CD. Os resultados revelaram que a TM- β -CD é superior a outras CDs avaliadas. A melhor capacidade de separação dos estereoisômeros pela TM- β -CD é atribuída a presença de anéis de glicose em número ímpar, o que aumenta a assimetria na CD (BLANCO, VALVERDE, 2003). Um outro derivado neutro de CDs é a 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD). Essa CD vem resolvendo diversos fármacos, entre eles o nadolol, propranolol e a epinefrina (GÜBITZ, SCHMID, 1997).

Apesar do grande número de aplicações, essas CDs neutras só podem resolver analitos carregados (BLANCO; VALVERDE, 2003). A necessidade em se resolver analitos neutros levou à síntese de CDs carregadas. Assim, foram sintetizadas a carboximetil- β -CD (CM- β -CD), a CD- β -sulfatada (S- β -CD) e a sulfobutíléter- β -CD (SBE- β -CD), que são todas aniônicas. O representante catiônico desse grupo é a 2-hidroxipropil-trimetilamônio- β -CD (QA- β -CD). A CM- β -CD possui grupos carboxilas que estão protonados em pH abaixo de 4 e dissociados em pH acima de 4. Essa CD tem sido usada na resolução de diversos fármacos

catiônicos. Essa CD pode também resolver compostos ácidos se o pH utilizado for suficiente para manter seus grupamentos carboxílicos dissociados (FILLET; HUBERT, CROMMEN, 1997). A interação dessa CD com o analito muda grandemente com o pH, sendo que um analito catiônico pode se comportar como um ânion e migrar em direção ao cátodo se suas interações com a CD forem suficientemente fortes (BLANCO; VALVERDE, 2003). Em contraste com a CM- β -CD, a S- β -CD está carregada negativamente em qualquer pH usado. Essa CD tem mostrado uma boa capacidade de enantioresolução e, em um estudo onde 56 analitos quirais foram testados, a S- β -CD foi capaz de resolver 46 analitos (STALCUP; GAHM, 1996). A SBE- β -CD também é uma CD aniônica em qualquer pH utilizado. Essa CD vem resolvendo uma variedade de compostos incluindo substâncias ilícitas, estimulantes e agentes de interesse forense (CHANKVETDAZE; ENDRESZ; BLANSCHKE, 1994). As CDs catiônicas vem sendo pouco utilizadas, sendo seu uso voltado mais para área de bioquímica, na análise de anticoagulantes, peptídeos e ácidos orgânicos (BUNKE; JIRA, 1998).

1.4- PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Técnicas de separação, tais como cromatografia e eletroforese capilar, são bem adequadas para análise de amostras complexas, com diversos componentes. Contudo, a análise de analitos presentes em matrizes complexas, tais como plasma, soro, sangue, homogenatos de tecidos, saliva ou urina requer um processo de preparação bem elaborado (GILAR; BOUVIER; COMPTON, 2001). As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas, ao nível de traços (HUBERT et al., 1999; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Embora muitas técnicas tradicionais de preparação ainda estejam em uso, as tendências apontam no sentido de (SMITH, 2003):

- ✓ Utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços;
- ✓ Maior seletividade e especificidade na extração;
- ✓ Aumento no potencial para automação ou métodos “on line” reduzindo assim a operação manual;
- ✓ Métodos menos agressivos ao meio ambiente, com menos desperdício e o uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos.

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), extração com fluido supercrítico (SCFE), extração em membranas (ME) e microextração em fase sólida (SPME) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; KATAOKA, 2003; SMITH, 2003). Somente as técnicas de extração em membranas e microextração em fase sólida serão discutidas nesse trabalho.

1.4.1- EXTRAÇÃO EM MEMBRANA

Uma membrana é uma barreira seletiva entre duas fases, sendo que a fase onde a amostra é aplicada é denominada doadora e a fase onde o solvente é aplicado e para onde os analitos migram é denominada receptora. A separação é obtida devido à capacidade da membrana de transportar alguns componentes da fase doadora para a receptora mais rapidamente que outros. Em geral, uma membrana nunca é uma barreira semi-permeável perfeita (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). O fenômeno que ocorre quando uma espécie passa através de um meio é chamado de permeação. Os mecanismos envolvidos na permeação baseiam-se em forças dirigidas: diferença de concentração, diferença de potencial elétrico ou diferença de pressão. Atualmente as aplicações para análises em matrizes biológicas têm se concentrado nas técnicas que levam ao fluxo molecular baseadas em forças dirigidas de concentração (diálise) e de pressão (ultrafiltração), sendo que pouquíssimas aplicações da técnica baseada em diferença de potencial elétrico (eletrodiálise) têm sido encontradas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

1.4.1.1- MICROEXTRAÇÃO EM FASE LIQUIDA (LPME) UTILIZANDO MEMBRANAS CILÍNDRICAS

LPME foi introduzida em 1996 e envolve o uso de uma microgota de um solvente orgânico suspendida na ponta da agulha de uma microseringa (JEANNOT; CANTWELL, 1996) e mergulhada em uma matriz aquosa (Figura 4A). Os analitos presentes na amostra são extraídos para essa microgota que, subsequente é aspirada para dentro da seringa e o extrato é assim analisado (JEANNOT; CANTWELL, 1996). Contudo, LPME baseada em gota suspensa não é uma técnica muito robusta (KRAMER; ANDREWS, 2001) já que as gotas podem ser perdidas durante o processo de extração, principalmente quando as amostras são agitadas vigorosamente. Além disso, amostras biológicas como plasma podem emulsificar quantidades substanciais de solventes orgânicos, afetando a estabilidade da gota durante o processo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Baseados na capacidade de pré-concentração, seletividade e baixo consumo de solventes orgânicos dessa promissora técnica, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) introduziram uma alternativa para o uso da LPME. Esse sistema é baseado no uso de uma simples, descartável, barata e porosa membrana cilíndrica feita de polipropileno. Um recipiente pequeno (vial) é preenchido com a amostra aquosa de interesse (solução doadora) e um pedaço da membrana de polipropileno é mergulhado nessa amostra, sendo suas extremidades ligadas a 2 microseringas (sistema em “U”) (Figura 4B). O volume da amostra aquosa é tipicamente 0,1 a 4 mL, dependendo da aplicação e o comprimento da membrana fica entre 1,5 - 10 cm. Devido as dificuldades no manuseio de 2 microseringas, foram desenvolvidos sistemas utilizando 1 microseringa (Figura 4C), com a membrana fechada em uma das extremidades (ZHU; ZHU; LEE, 2001; ANDERSEN et al., 2003). Antes da aplicação, a fibra é mergulhada em um solvente orgânico para imobilizá-lo nos poros da membrana, sendo o excesso removido, normalmente, por ultra-som. O solvente deve ser imiscível em água para assegurar sua permanência nos poros durante todo o processo de extração. O solvente orgânico forma uma camada fina na parede da membrana que

tipicamente possui uma espessura de 200 μm ; o volume total de solvente orgânico imobilizado fica ao redor de 15 - 20 μL .

Figura 4- LPME convencional (A), sistema em “U” utilizando membrana cilíndrica (B) e sistema utilizando a membrana com a ponta fechada (C).

Assim, os analitos são extraídos da amostra aquosa pela fase orgânica presente nos poros da membrana e daí para a solução aceitadora presente no interior da membrana. A solução aceitadora é injetada antes do início da extração por uma das seringas presa na extremidade da membrana. Dependendo da solução aceitadora, o sistema pode ser constituído por 2 ou 3 fases (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJEGAARD, 2004) (Figura 5):

- ✓ Sistema de 2 fases: nesse sistema a solução aceitadora é o próprio solvente orgânico utilizado na impregnação dos poros da membrana;
- ✓ Sistema de 3 fases: Nesse sistema a solução aceitadora é uma solução aquosa com pH oposto ao da solução doadora. Assim, após o analito deixar a solução doadora na sua forma neutra e passar pelo solvente orgânico presente nos poros da membrana, ele é ionizado na solução aceitadora e impedido de voltar novamente para a solução doadora.

Terminada a extração, a solução aceitadora é retirada da membrana por uma das micro-seringas e o extrato é assim analisado. Já que a solução aceitadora é aquosa, esse tipo de sistema é ideal para o uso em eletroforese capilar.

Figura 5 -Esquema de LPME em 2 e 3 fases.

Diferentes parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método utilizando membranas cilíndricas, tais como: ajuste do pH da amostra, força iônica, membrana de extração, volume da amostra (solução doadora), tipo de solvente orgânico, tempo de extração, solução aceitadora e agitação do sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

➤ MEMBRANA DE EXTRAÇÃO

As membranas capilares empregadas em LPME devem ser hidrofóbicas e compatíveis com os solventes orgânicos utilizados. Tais requisitos são cumpridos pelas membranas baseadas em polipropileno, disponíveis comercialmente (Membrana, Wuppertal, Alemanha) (Figura 6). Destas, a mais comumente empregada apresenta diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm , e poros com tamanho de 0,2 μm , o que fornece eficaz microfiltração, impedindo a passagem de macromoléculas (ANDERSEN et al., 2002).

Figura 6- Membranas utilizadas no processo de LPME (Membrana®)

➤ SOLVENTE ORGÂNICO

Uma etapa fundamental na otimização de métodos na LPME é a seleção do solvente orgânico. 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), fácil impregnação nos poros da mesma e solubilidade adequada para o analito de interesse (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004, PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Vários solventes orgânicos têm sido utilizados como: éter diexílico, n-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol, ou misturas desses solventes (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

➤ TEMPO DE EXTRAÇÃO

A eficiência da extração na LPME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora (no caso de sistemas em três fases). Este é um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô. Nesse ponto, o equilíbrio é atingido e a distribuição do analito entre as fases permanece constante (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE, 2003). Muitas vezes, o tempo

necessário para que o equilíbrio seja atingido é excessivamente longo; nesses casos, a extração é feita em condições de não equilíbrio, controlando muito bem o tempo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

➤ 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). Embora utilizada em diversos trabalhos, a agitação induzida por uma barra magnética pode provocar contaminação cruzada das amostras e a formação de bolhas de ar que tendem a se aderir na superfície da fibra cilíndrica, acelerando a evaporação do solvente e introduzindo imprecisão nas medições (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2000).

➤ PH DA FASE DOADORA

O pH da amostra é crucial para a eficiente extração de compostos ácidos e básicos. O ajuste do pH resulta em uma maior razão de distribuição e garante elevados valores de recuperação do analito de interesse (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2000). Ajustes no pH podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra.

➤ ADIÇÃO DE SAL NA FASE DOADORA

O efeito da adição de sais a matriz é complexo. A adição de sais pode aumentar a eficiência da extração, particularmente para analitos mais polares, devido ao efeito denominado “salting-out” (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Entre os sais empregados como aditivos na fase doadora, o cloreto de sódio é o mais comum.

➤ MODIFICADORES ORGÂNICOS

Muitos fármacos estão ligados a proteínas das matrizes biológicas de forma bastante intensa e essas interações podem ser as responsáveis por uma baixa recuperação. As ligações fármaco-proteína ocorrem devido a interações iônicas, hidrofóbicas ou mesmo polares. As interações hidrofóbicas podem ser suprimidas pela adição de alguns solventes orgânicos à matriz contendo o fármaco de interesse. Solventes orgânicos (ex.: metanol) têm a habilidade de quebrar essas interações hidrofóbicas e polares (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Por outro lado, o metanol pode afetar a distribuição do analito entre a fase aquosa e o solvente orgânico, reduzindo a eficiência da extração.

➤ REAGENTES PARA FORMAÇÃO DE PARES IÔNICOS

Há duas formas de emprego desta técnica na extração por LPME, (1) adição de um reagente aniônico (Q^-) ou (2) adição de um reagente catiônico (Q^+) à amostra. Nesses casos, o pH terá um 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). Para análise de compostos de caráter básico, ácidos octanóico e decanóico ou sais destes vêm sendo utilizados com sucesso (HO et al., 2003). Uma característica marcante deste tipo de extração é o uso de álcoois lipofílicos de cadeia longa (ex.: n-octanol) como fase orgânica devido o caráter polar residual dos pares iônicos formados, requerendo solventes de média polaridade para eficaz solvatação.

➤ FASE ACEPTORA NO SISTEMA DE TRÊS FASES

Na LPME de três fases direcionada para extração de fármacos de caráter básico, o pH da fase aceptora 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 aceptora aquosa (UGLAND et al., 2003). Nesse modo trifásico empregado para fármacos básicos, diversas soluções ácidas vêm sendo utilizadas

como solução aceptora, como ácido clorídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido trifluoracético. Para extração de compostos ácidos, ao contrário, soluções de hidróxido de sódio 0,01 - 0,1 mol L⁻¹ vêm sendo empregadas como fase aceptora (PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000).

1.4.2- MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

SPME é uma microtécnica, introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990, em que os processos de extração e pré-concentração dos analitos ocorrem através da distribuição entre a fase extratora e a matriz. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de sílica fundida de 100 µm de diâmetro e com a extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Pelo deslocamento do êmbolo, a fibra é exposta à matriz e assim a extração tem início. Quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior a quantidade extraída. O processo de extração é controlado pelas propriedades físico-químicas do analito, da amostra e do polímero extrator. Uma vez atingido o equilíbrio ou um tempo bem definido, a fibra é retraída para dentro da agulha e introduzida no instrumento analítico onde os analitos podem ser dessorvidos termicamente (GC) ou redissolvidos em um solvente apropriado para HPLC ou CE (THEODORIDIS et al., 2000). As espessuras das fibras comerciais variam de 7 µm a 100 µm e seus volumes de 0,03 µL a 0,7 µL. A extração pode ser feita de duas maneiras:

- Extração direta: a fibra é mergulhada diretamente na solução da amostra. Durante a extração, a amostra é agitada e o tempo é controlado. Após esta etapa, a fibra é recolhida para dentro da agulha do sistema extrator (Figura 7A). A extração direta é empregada quando o analito não é volátil ou, no caso de analitos voláteis, quando a amostra não é tão complexa;

➤ “Headspace”: esse sistema de extração requer que o analito seja volátil para poder entrar em contato com a fibra que não entra em contato direto com a solução. A amostra é freqüentemente aquecida e os componentes voláteis são ad/absorvidos na fibra (Figura 7B).

Figura 7- Esquema do dispositivo para extração direta (A) e “headspace”(B) (ULRICH, 2000).

Existem diferentes tipos de fibras que podem ser usadas dependendo das propriedades físico-químicas do analito a ser extraído, sendo essas propriedades cruciais para os processos de extração (VALENTE; AUGUSTO, 2000; THEODORIDIS et al., 2000). A escolha da fibra está também relacionada com a massa molecular do analito: para compostos que possuem pequena massa molecular, uma alta extração pode ser conseguida com fibras menos espessas (THEODORIDIS et al., 2000). As principais fibras de SPME disponíveis comercialmente estão listadas no Tabela 5.

Tabela 5- Fibras de SPME disponíveis comercialmente (SUPELCO, 1999).

Composição química	Espessura (µm)	Descrição da fase estacionária	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	Não-ligada	GC / HPLC
	30	Não-ligada	GC / HPLC
	7	Ligada	GC / HPLC
Poliacrilato (PA)	85	Ligada	GC / HPLC
Polidimetilsiloxano / Divinilbenzeno (PDMS / DVB)	60 ^c	Ligada	HPLC
	65	Ligada	GC
Carbowax / Divinilbenzeno (CW / DVB)	65	Ligada	GC
	70	Ligada	GC
Carbowax / Templated resin (CW / TPR)	50 ^c	Ligada	HPLC
Divinilbenzeno / Carboxen / PDMS (DVB / CAR / PDMS)	50/30	Ligada	GC
	50/30 ^b	Ligada	GC
Carboxen / PDMS (CAR/PDMS)	75	Ligada	GC
	52	Ligada	GC

^a Fases não-ligadas são estáveis a alguns solventes orgânicos solúveis em água, mas alguma degradação pode ocorrer; nunca usar com solventes orgânicos apolares. Fases ligadas são estáveis a todos solventes orgânicos, alguma degradação pode ocorrer quando usado com alguns solventes orgânicos apolares; ^b comprimento especial de 2 cm; ^c essas fibras são mais duráveis que outras pois não contem epóxido (SUPELCO, 1999).

1.4.2.1- EXTRAÇÃO

O processo de extração freqüentemente precisa ser otimizado para melhorar as condições de extração do analito. Os parâmetros que podem ser alterados são: temperatura, força iônica, adição de modificador orgânico, volume da amostra, pH, tempo de extração (THEODORIDIS et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000).

- ✓ Tempo de extração: O tempo ótimo de extração é o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e assim resultar no máximo de recuperação do analito, como mencionado para LPME. Porém, esse tempo depende de vários fatores como, espessura da fibra utilizada, coeficiente de difusão do soluto, agitação e temperatura do sistema e, muitas vezes, a extração é feita antes do equilíbrio ser atingido.
- ✓ Agitação: a agitação do sistema é utilizada com o objetivo de melhorar a recuperação do analito, diminuir o tempo de extração e de equilíbrio. Métodos de agitação que podem ser usados incluem: agitação magnética, sonificação e vibração da fibra extratora.
- ✓ pH: o ajuste do pH pode melhorar a extração principalmente de compostos que podem estar protonados ou não. O pH é ajustado com o objetivo de obter o analito na sua

forma neutra. Cuidados no ajuste do pH devem ser tomados principalmente no método de extração por imersão direta, já que valores extremos de pH podem deteriorar as fibras extratoras.

- ✓ Temperatura: SPME é um processo de equilíbrio, mas freqüentemente a extração é finalizada antes do sistema atingir esse equilíbrio. Nesse caso, um aumento na temperatura pode aumentar a extração, favorecendo que o sistema atinja esse estado de equilíbrio mais rapidamente. Por outro lado, o aumento da temperatura pode diminuir a porcentagem de extração por diminuir a constante de distribuição.
- ✓ Força iônica: a adição de um eletrólito pode melhorar a recuperação do analito pelo processo “salting out”. Esse processo é saturável sendo que o aumento da recuperação é relatado até uma concentração ótima do eletrólito e concentrações maiores diminuem a recuperação do analito.

1.4.2.2- DESSORÇÃO

Após a extração dos analitos presentes na matriz há necessidade de “liberar” essas substâncias da fibra para serem analisadas. Em HPLC, a dessorção pode ser feita de 2 modos:

- 1- Modo “on-line”: nesse método os analitos presentes na matriz são dessorvidos diretamente no sistema cromatográfico através de uma interface conectada ao injetor do cromatógrafo (Figura 8). Após, os analitos seguem diretamente para a coluna e assim são analisados. Nesse tipo de dessorção, somente cromatografia no modo reverso é indicada. Existem 2 maneiras de se proceder a dessorção:
 - *Modo dinâmico*: Nesse modo os analitos são dessorvidos pelo fluxo da fase móvel que passa pela fibra “retirando” os analitos (Figura 8A). É utilizado principalmente quando a fase móvel contém altas quantidades de modificador orgânico (> 50%) e quando os analitos eluem rápido para a coluna.
 - *Modo estático*: Nesse modo, a câmara de dessorção presente na interface, é previamente preenchida com um solvente apropriado, a fibra é introduzida e, após

um tempo pré-determinado, a fase móvel passa pela câmara levando os analitos para a coluna (Figura 8B). Esse modo é útil quando o modo dinâmico falha em dessorver os analitos, resultando em recuperações pobres e picos assimétricos. Somente solventes orgânicos miscíveis na fase móvel devem ser utilizado nesse modo de dessorção.

Figura 8- Esquema de dessorção “on-line” modo dinâmico (A) e modo estático (B) (LORD e PAWLISZYN, 2000).

2- Modo “off-line”: nesse método o procedimento de dessorção é realizado separadamente do sistema cromatográfico. A fibra é mergulhada em um frasco contendo o solvente de dessorção e, após algum tempo retraída (Figura 9). Em seguida, o solvente é evaporado e o resíduo dissolvido na fase móvel e injetado na coluna. Quando o solvente de dessorção é a própria fase móvel pode-se injetar diretamente na coluna sem que haja necessidade de evaporação. Nesse modo, pode-se usar cromatografia em modo normal ou reverso.

Figura 9- Esquema de dessorção "off-line".

1.5- FÁRMACOS SELECIONADOS

1.5.1- IBUPROFENO (IBU)

1.5.1.1- REVISÃO DA LITERATURA

O ibuprofeno [ácido ($\pm$)-2-(4-isobutilfenil) propiônico], um dos mais comuns anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), é considerado o protótipo da família do ácido 2-arilpropiônico (NICHOLSON, 1982). O ibuprofeno foi desenvolvido como fármaco anti-reumático em 1960 (ADAMS et al., 1967) e, desde 1984, tornou-se um fármaco de venda livre nos Estados Unidos e Inglaterra. O ibuprofeno é um potente inibidor da síntese de prostaglandinas; trabalhos mostram que o (+)-(S)-ibuprofeno é 160 vezes mais potente do que (-)-(R)-ibuprofeno em inibir a síntese de prostaglandinas *in vitro* (ADAMS; BRESLOFF; MASON, 1976; EVANS; 1992, 2001). No tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, gota artrítica aguda e dismenorréia, doses terapêuticas de ibuprofeno têm provado ser tão eficaz quanto outros AINES. Complicações gastrointestinais são os efeitos adversos mais comuns, porém, disfunção renal também pode ocorrer (BUSSON, 1986; DAVIES; AVERY, 1971). O ibuprofeno é rapidamente absorvido após administração oral, sendo o pico de concentração plasmática observado após 3 horas. O volume de distribuição aparente, determinado após administração oral, fica entre 6,3 e 23,5 litros em humanos ($0,1$ a $0,2 \text{ L Kg}^{-1}$), o que se aproxima do volume plasmático e sugere que

a ligação aos tecidos é menor que às proteínas plasmática (DAVIES, 1998). O ibuprofeno é extensivamente (>98%) ligado à albumina plasmática em concentrações terapêuticas (AARONS; GRENNAN; SIDDIQUI, 1983). A ligação dos estereoisômeros é estereosseletiva, com uma maior fração de (+)-(S)-ibuprofeno livre (AVGERINOS, HUTT, 1990). A porcentagem não-ligada de cada estereoisômero é dependente da concentração (MONTERO, ESTELRICH, VALLS, 1990).

No processo de metabolização, o ibuprofeno sofre uma reação de inversão quiral, na qual o estereoisômero (R)- inativo é transformado no estereoisômero (S)- ativo (ADAMS et al., 1967; MILLS et al., 1973, BAILLIE et al., 1989; RUDY et al., 1991). A inversão aparentemente procede via ativação enzimática estereosseletiva do (-)-(R)-ibuprofeno a (-)-(R)-ibuprofenil-adenilato, seguido pela formação de um tioéster acil-Coenzima A, por uma acil-CoA sintetase. Os tioésteres são substratos para a epimerase. (+)-(S)-ibuprofeno não é ativado a derivados de adenilato e, portanto, não é capaz de formar um tioéster-CoA. O (-)-(R)-ibuprofeno-CoA é epimerizado e, com subsequente atividade da hidrolase, (-)-(R) e (+)-(S) estereoisômeros são liberados (WECHTER et al., 1974, KNIHINIICKI; DAY; WILLIAMS, 1989; 1991) (Figura 10). O metabolismo do ibuprofeno envolve ainda a sua transformação em dois metabólitos principais, 2-hidroxiibuprofeno (2-IBUOH) (1 centro quiral) e carboxiibuprofeno (IBUCOOH) (2 centros quirais), bem como a dois outros metabólitos (1-hidroxiibuprofeno e 3-hidroxiibuprofeno), além de seus derivados conjugados com ácido glicurônico (KEPP, SILLELMANN, HANSEN, 1997) (Figura 11). A isoenzima CYP2C9 tem sido identificada como a mais importante para a formação dos metabólitos oxidados do ibuprofeno (LEEMAN et al., 1993). A recuperação urinária do ibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno e carboxiibuprofeno (livres e conjugados), após uma dose de 400 mg do racemato, somam, respectivamente, 11%, 23% e 40% da dose após um período de 24 horas. Exames da composição estereoquímica do fármaco e seus metabólitos na urina indicam que 74% da dose apresenta a configuração (+)-(S)- (TAN et al., 2002; SMITH et al., 1994).

O metabolismo do ibuprofeno via glicuronidação e rotas de oxidação mostrou ser enantiosseletivo para o (+)-(S)-ibuprofeno (TAN et al., 2002; EL-MOUEHI et al., 1987; LEE

et al., 1985). A razão enantiomérica (S/R) dos derivados glicuronídicos foi 7,1, 4,8 e 3,4 para o ibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno e carboxiibuprofeno, respectivamente (TAN et al., 2002).

Figura 10- Esquema mostrando a inversão metabólica quiral do ibuprofeno

Figura 11- Esquema mostrando a rota metabólica do ibuprofeno (KEPP; SILLELMANN; HANSEN, 1997).

1.5.1.2- ANÁLISE ESTEREOSELETIVA DO IBUPROFENO E DE SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS EM URINA

A análise enantiosseletiva do ibuprofeno em matrizes biológicas é bem discutido na literatura, tanto por análises indiretas através de reações de derivatização quiral (BAUZA, RIOS, VALCÁRCEL, 2001; TAN et al., 1997a, LEMKO, CAILLE, FOSTER, 1993; WRIGHT et al., 1992; RUDY et al, 1990; NICOLL-GRIFFITH et al., 1988), como por análise direta utilizando FEQs baseadas em polissacarídeos (BONATO, DEL LAMA, DE CARVALHO, 2003, TAN et al., 1997b, TAN et al., 1997c), em proteínas (DE VRIES, SCHMITZ-KUMMER, SIEMON, 1994; PETTERSSON, OLSSON, 1991) e em ciclodextrinas (GEISSLINGER, et al., 1989). A análise enantiosseletiva do ibuprofeno também já foi descrita por eletroforese capilar (GLOWKA, KARAZNIEWICS, 2005; JABOR, LANCHOTE, BONATO, 2002). Dada a extensa literatura existente a respeito da análise enantiosseletiva do ibuprofeno e o objetivo desse trabalho, somente serão descritos com mais detalhes os métodos que envolvem a determinação do IBU e seus metabólitos em urina. Destaca-se entretanto, que em todos os métodos descritos na literatura foram empregadas técnicas convencionais de preparação das amostras (SPE e LLE).

Tan et al (1997a), propuseram a análise enantiosseletiva do ibuprofeno em urina após derivação quiral com (*R*)-1-(nafit-1-il)etilamina. Nesse método, os estereoisômeros do ibuprofeno foram separados utilizando uma coluna C₁₈ e fase móvel formada por tampão fosfato (pH 3,5, 10 mmol L⁻¹) : acetonitrila (50 : 50 v,v), com um tempo total de análise de 26 minutos. Adicionalmente, existem poucos trabalhos relatando a análise estereosseletiva dos principais metabólitos do ibuprofeno. Rudy et al (1990), utilizando a extração líquido-líquido, desenvolveram um método estereoespecífico para análise dos principais metabólitos do ibuprofeno (carboxiibuprofeno e 2-hidroxiibuprofeno) em urina, usando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Nesse trabalho, os autores conseguiram a separação dos quatro estereoisômeros do carboxiibuprofeno e dos dois estereoisômeros do 2-hidroxiibuprofeno usando uma coluna C₈ e água:metanol:n-butanol (62 : 30 : 8, v/v) como

fase móvel, após derivação quiral com S-(α)-metilbenzilamina. Nesse trabalho, todos os estereoisômeros foram resolvidos perfeitamente, porém, o tempo de análise foi de aproximadamente 80 minutos.

Tan et al (1997b), utilizando uma técnica de análise cromatográfica aquiral-quiral resolveu os 4 estereoisômeros do carboxiibuprofeno, após extração líquido-líquido dos metabólitos da urina. Inicialmente, os estereoisômeros do carboxiibuprofeno foram separados do ibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno e outros componentes endógenos usando uma coluna não quiral (sílica) e, a seguir, a análise estereosseletiva foi feita usando uma coluna quiral a base de amilose [amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato), CHIRALPAK AD[®]] e fase móvel composta por hexano:etanol (92 : 8 v/v) + TFA (0,05%). O tempo total da análise foi de 20 minutos.

No mesmo ano, Tan et al (1997c), seguindo o sucesso da análise do carboxiibuprofeno, desenvolveram uma seqüência de análise cromatográfica aquiral-quiral para análise estereosseletiva simultânea do carboxiibuprofeno e 2-hidroxiibuprofeno. A análise dos metabólitos separados foi obtida empregando a mesma metodologia descrita anteriormente. Porém, quando os metabólitos foram analisados juntos, foi necessário mudar a composição da fase móvel para hexano:metanol:etanol (95 : 3,5 : 1,5 v/v/v) + TFA (0,05%) mas, mesmo assim, a resolução foi mais pobre e o tempo requerido para análise completa foi muito longo, 50 minutos.

1.5.2- HIDROXICLOROQUINA (HCQ)

1.5.2.1- REVISÃO DA LITERATURA

A HCQ é um fármaco comercializado como uma mistura racêmica e foi primeiramente utilizada no tratamento da malária (BROCKS; MEHVAR, 2003). Posteriormente foi empregada em diversas doenças autoimunes como artrite reumatóide (BELL, 1983), lúpus eritematoso sistêmico (ESDAILE, 1993) e estomatite ulcerativa crônica (WORLE et al., 1997). O mecanismo de ação da HCQ na malária deve-se em parte ao fato de ser uma base

fraca. Esse fármaco concentra-se em altos níveis e eleva o pH nos vacúolos alimentares acídicos dos parasitas, provocando ali alterações histológicas características, como indução de um agrupamento rápido do pigmento. Os mecanismos responsáveis por essas alterações histológicas ainda não foram esclarecidos. A digestão da hemoglobina do hospedeiro dentro dos vacúolos alimentares acídicos dos plasmódios libera heme (ferriprotoporfirina IX), um produto tóxico, com propriedades membranolíticas. O heme, por sua vez, é detoxificado pela conversão a pigmento malárico insolúvel e inofensivo (hemeazoína) (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996). O mecanismo da HCQ nas doenças autoimunes é controverso, mas existem tanto efeitos imunológicos quanto antiinflamatórios. Os mecanismos de ação incluem a inibição de fosfolipase 2; efeitos lisossômicos (aumento no pH, estabilização da membrana, inibição de liberação e atividade de enzimas lisossômicas); inibição de fagocitose; inibição da produção de superóxido; aumento de pH intracelular nos vacúolos citoplasmáticos, levando à estimulação diminuída de células T CD4+ auto-imunes; diminuição da liberação de citocina dos monócitos estimulados; inibição da produção de anticorpos e atividade antioxidante (FOX, 1993). A estereosseletividade ainda não foi comprovada na ação dos enantiômeros da HCQ. Outros efeitos têm sido notados com o uso da HCQ, como melhora do controle glicêmico em pacientes diabéticos (QUATRARO et al., 1990) e aumento da eficácia da insulina pela redução da taxa de degradação em frações citosólicas de fígado de rato (EMAMI et al., 1999).

A farmacocinética da HCQ tem sido bem reportada. Métodos de deconvolução têm sido utilizados para estimar a fração da dose absorvida e mostrou que a absorção dos enantiômeros da HCQ não é estereosseletiva (MCLACHAN et al., 1994). Uma característica comum da HCQ e outros antimaláricos é a extensiva distribuição para os tecidos do corpo, levando a um grande volume de distribuição desses fármacos. O extensivo volume de distribuição é responsável pelos longos valores de meia-vida apresentados pela HCQ. Um modesto grau de estereosseletividade foi observado no volume de distribuição da HCQ, sendo aproximadamente de 7100 e 8600 L para (-)-(R)- e (+)-(S)-HCQ, respectivamente (MIDHA et al., 1996). A ligação estereosseletiva da HCQ às proteínas plasmáticas tem sido

investigada e mostrou ser enantiosseletiva (BROCKS et al., 1994; MCLACHLAN, CUTLER, TETT, 1993). Os estudos mostraram que o enantiômero (+)-(S)- é ligado às proteínas plasmáticas em um maior grau do que o enantiômero (-)-(R)-. Contudo, essa informação tem pouca relevância clínica já que o grau de ligação as proteínas plasmáticas é pequeno. A concentração total e o grau de estereosseletividade são diferentes no sangue total, plasma e soro (MIDHA et al., 1996; TETT et al., 1994; DUCHARME et al., 1995). A razão de (R)/(S) para HCQ é aproximadamente 1 no plasma, enquanto que no sangue total e no soro, a razão (R)/(S) observada foi próxima a 2 (BROCKS et al., 1994).

HCQ passa por um extenso metabolismo oxidativo e três metabólitos são produzidos: desetilcloroquina (DCQ), desetilhidroxicloroquina (DHCQ) e bisdesetilcloroquina (BDCQ) que também são quirais (Figura 12). A quantidade excretada acumulada em um período de 48 horas da HCQ, DCQ e DHCQ foi de 2,5%, 0,04% e 0,04%, respectivamente. A concentração de BDCQ foi muito baixa e sua quantidade não pode ser quantificada (IREDALE, FIEGER, WAINER, 1993). Nesse estudo, a excreção do enantiômero (+)-(S)- foi maior quando comparada ao enantiômero (-)-(R)-, contudo não foi realizado qualquer cálculo estatístico comprovando a estereosseletividade na excreção. O “clearance” renal da HCQ mostrou ser estereosseletivo para o enantiômero (+)-(S)- com uma razão (S)/(R) de 2,2 quando os cálculos foram realizados usando o sangue total. Quando os cálculos foram realizados utilizando o plasma enquanto a mesma razão foi de 1,4 (MCLACHLAN et al., 1993; TETT et al., 1994). Uma observação interessante apresentada em um estudo realizado por Fieger, Iredale, Wainer (1993) foi à inversão da razão (S)/(R) em longos períodos de excreção. Durante o período inicial de 0-4 horas, a amostra de urina continha 60% de (+)-(S)-HCQ e 40% de (-)-(R)-HCQ. A razão (+)/(-) diminui vagarosamente e durante o período de 168-360 horas a proporção foi de 1 : 1. A partir de 672-696 horas, ocorre uma inversão na proporção (+)/(-) e por volta de 2.040-2.064 horas a proporção foi de 30 : 70. Ao contrário do que foi observado para HCQ, os metabólitos não sofrem essa inversão na razão (+)/(-).

Figura 12 -Hidroxicloroquina e seus metabólitos. *Centro quiral

1.5.2.2- ANÁLISE ESTEREOSSELETIVA DA HCQ E SEUS METABÓLITOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

Apesar de existirem diversos trabalhos que envolvem a análise enantiosseletiva da HCQ e seus metabólitos em fluidos bioológicos, são poucos os trabalhos que descrevem o desenvolvimento de métodos.

O primeiro método foi descrito por McLachlan et al (1991). Inicialmente a HCQ e seus metabólitos foram extraídos de urina e sangue total por extração líquido-líquido, utilizando éter dietílico e, posteriormente separados em cromatografia convencional utilizando uma coluna de poliestireno-divinilbenzeno (150 x 4,1 mm) e fase móvel composta por metanol : água (70 : 30, v/v), pH ajustado para 11 com 100 mmol L⁻¹ de trietanolamina. Em seguida, a HCQ e seus metabólitos foram coletados no sistema aquiral e injetados separadamente no sistema quiral. Nesse método, a coluna empregada foi a Chiral AGP® e a fase móvel foi composta por solução de fosfato de sódio 16 mmol L⁻¹ com 5,5% de isopropanol e 0,02% de N,N-dimetiloctilamina (DMOA), pH ajustado para 7 com NaOH 1 mol L⁻¹. Esse método apresenta algumas desvantagens como o tempo necessário para realizar as coletas e

posteriores injeções e o tempo de análise, sendo que o último estereoisômero [(S)-BDCQ] elui em 52 minutos.

Posteriormente, Fieger, Iredale, Wainer (1993) e Iredale, Fieger, Wainer (1993) desenvolveram dois métodos, nos quais a HCQ e seus metabólitos são analisados somente em urina e, em plasma e urina, respectivamente. Nesses métodos, a extração líquido-líquido também é realizada com éter dietílico e, posteriormente, os analitos são separados por HPLC em 2 etapas. Inicialmente, a separação é realizada em uma coluna aquiral (Ultremex Cyano[®], 75 x 4,6 mm) com fase móvel composta por solução de fosfato N,N-DMOA 0,02 mol L⁻¹: acetato de amônio 0,06 mol L⁻¹ (40 : 60, v/v) pH 4,5 e detecção por UV. Em seguida, o fármaco e seus metabólitos foram coletados nesse sistema e injetados no sistema quiral. Nesse sistema, a coluna empregada também foi a Chiral AGP[®] (150 x 4,6 mm) e a fase móvel foi constituída por solução tampão fosfato de sódio 0,03 mol L⁻¹ pH 7 : etanol : acetonitrila (79 : 20 : 1, v/v/v) contendo 0,005 mol L⁻¹ de N,N-DMOA. Nesse método, o último estereoisômero elui em torno de 30 minutos [(+)-(S)-DCQ]. A diferença entre esses dois métodos reside na aplicação. O primeiro método é utilizado para análise da HCQ e seus metabólitos somente em urina em um período de 2.064 horas. Já o segundo método, é utilizado para a análise da HCQ em plasma após um período de coleta de 24 horas e da HCQ e seus metabólitos em urina após um período de 48 horas.

Um fato interessante a ser mencionado quanto a esses métodos é que a cloroquina foi utilizada como padrão interno. A cloroquina também é um fármaco empregado no tratamento da malária e reumatismo e também possui uma longa meia-vida de eliminação (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996) portanto; seu emprego como padrão interno pode levar a resultados errôneos, gerando valores sub ou superestimados.

Outro método descrito para análise da HCQ e seus metabólitos foi relatado em 1994 por Wey, Nigard, Khalil. Nesse método, a análise da HCQ e seus metabólitos é realizada em sangue total, e com detecção por fluorescência. A extração empregada foi a líquido-líquido, utilizando uma mistura de acetato de etila : isopropanol (90 : 10 v/v) como solvente extrator. Mais uma vez, a separação é realizada em duas etapas. Na primeira, a separação é

realizada em uma coluna aquiral (cianopropil, 250 x 4,6 mm) e, em seguida, os enantiômeros são separados na coluna Chiral AGP® (100 x 4 mm, id. 5 µm) usando fase móvel composta por solução tampão fosfato de amônia 0,05 mol L⁻¹ com 0,005 mol L⁻¹ de dihexilamina pH 7 : isopropanol : acetonitrila (94 : 5 : 1, v/v/v). Nesse método, as separações aquiral e quiral são realizadas em 25 e 13 minutos, respectivamente. Vale a pena ressaltar que na separação quiral, cada analito é injetado separadamente.

Todos os métodos relatados anteriormente são empregados utilizando HPLC em duas etapas. É um fato de que esses métodos apresentam desvantagens, principalmente quanto ao número de etapas empregadas. Baseado nisso, nosso grupo de pesquisa se empenhou em desenvolver métodos, onde a separação enantiosseletiva da HCQ e seus metabólitos fosse realizada em uma só etapa. Assim, foram desenvolvidos dois métodos com aplicações em estudos de metabolismo *in vitro* (CARDOSO, BONATO, 2005; CARDOSO, JABOR, BONATO, 2006). No primeiro método, a separação estereosseletiva é realizada em uma coluna derivada de polissacarídeo (Chiralpak AD-RH®), utilizando hexano : isopropanol (92 : 8, v/v) + 0,1% de dietilamina como fase móvel. Nesse método, a coluna Chiralpak AD-RH®, empregada normalmente no modo fase reversa, foi utilizada no modo fase normal após inversão da polaridade da mesma (CASS et al., 2000). Apesar desse método possibilitar a separação da HCQ, a validação da metodologia foi realizada somente para os metabólitos, DCQ e DHCQ, já que o objetivo do estudo era quantificar a formação destes metabólitos em microssomas hepático de ratos, após incubação com HCQ. Nesse método, a extração empregada foi a líquido-líquido, com o último estereoisômero eluindo em 30 minutos.

O segundo método foi realizado por eletroforese capilar. Nesse método, todos os 8 estereoisômeros são separados em menos de 15 minutos. A extração empregada foi também a líquido-líquido. A separação foi obtida empregando um capilar de sílica não-recoberto com 42 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno. O tampão de análise empregado foi o tris(hidroximetil)aminometano (pH ajustado para 9 com ácido fosfórico) contendo 1% (m/v) de S-β-CD e 30 mg mL⁻¹ de HP-β-CD. Sem dúvida alguma,

esse método apresenta grandes vantagens em relação aos demais como a simplicidade, tempo de análise e economia de solvente orgânico, confirmando a eficiência da eletroforese capilar.

2-OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar duas novas microtécnicas de preparação de amostras, a SPME e a LPME, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar como técnicas de análise, para o desenvolvimento de métodos estereosseletivos para análise do ibuprofeno e seus principais metabólitos e da hidroxicloroquina e seus metabólitos em urina. Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Avaliação da cromatografia líquida de alta eficiência utilizando FEQs na resolução dos estereoisômeros do ibuprofeno e de seus metabólitos, 2-IBUOH, IBUCOOH, e da hidroxicloroquina e de seus principais metabólitos, DHCQ e DCQ;
- ✓ Utilização da eletroforese capilar com ciclodextrinas como seletor quiral na separação da hidroxicloroquina e seus metabólitos, DCQ, BDCQ e DHCQ;
- ✓ Desenvolvimento dos métodos para análise estereosseletiva por HPLC do ibuprofeno, 2-IBUOH e IBUCOOH e da hidroxicloroquina e seus principais metabólitos, DCQ e DHCQ, em urina utilizando SPME como técnica de preparo de amostra;
- ✓ Desenvolvimento de um método para análise estereosseletiva por CE da hidroxicloroquina e seus metabólitos, DHCQ, DCQ e BDCQ em urina, utilizando LPME como técnica de preparo de amostra;
- ✓ Validação dos métodos desenvolvidos;
- ✓ Aplicação dos métodos validados em estudos piloto para avaliar o perfil de excreção urinária desses fármacos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MATERIAIS

3.1.1- EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-10AT-VP de duplo pistão, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 µL, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A VP, e um integrador modelo CR6-A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Para as análises por CE foi empregado um equipamento de eletroforese capilar obtido da Agilent Technologies, modelo G1600A (Waldbronn, Alemanha), equipado com um amostrador automático, um analisador, um detector por arranjo de diodos e um sistema de aquisição de dados com o software Agilent ChemStation®.

O pHmetro utilizado nas aferições de pH das soluções aquosas foi o Corning, modelo 430 (Nova Iorque, EUA). Para degaseificação das fases móveis aquosas e das soluções utilizadas em CE foi empregado um aparelho de ultra-som da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, Brasil), juntamente com um sistema de vácuo. Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil) na homogeneização das amostras. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções.

Para o processo de microextração em fase sólida foi utilizado um agitador-aquecedor (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e fibras de extração de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) 60 µm, poliacrilato (PA) 85 µm e carbowax-templated resin (CW-TPR) 50 µm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As fibras de extração foram utilizadas empregando um amostrador também da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e outro desenvolvido pela oficina de precisão da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (Figura 13A)

Para o processo de microextração em fase líquida foi utilizado um agitador magnético da marca Corning (Nova Iorque, EUA), um suporte tipo haste comum, 2 microseringas

(uma de 50 μL e outra de 250 μL , Hamilton, Nevada, EUA). As extrações foram feitas empregando uma membrana de 7 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm , espessura de 200 μm e poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Wuppertal, Germany) (Figura 13B).

Para o processo de filtração das soluções utilizadas em CE foram empregados filtros Millex – HA com poros de 0,45 μm , obtidos da Millipore (Bedford, EUA).

Figura 13- Sistema de SPME (A) e LPME (B)

3.1.2- REAGENTES E SOLVENTES

Os solventes utilizados (grau cromatografia) foram acetonitrila e etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), hexano e isopropanol (EM Science, Gibbstown, EUA) e metanol

(Mallinckrodt Baker, Paris, França e Tedia, Fairfield, EUA). Os solventes empregados em LPME (grau analítico) foram: éter dibutílico, acetato de hexila, acetato de dodecila, 1-octanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), éter n-hexil (Alfa Aesar, Ward Hill, EUA) e acetato de butila (Mundial Química, Ribeirão Preto, Brasil).

Os reagentes (grau analítico) empregados na preparação das soluções tampão e nas fases móveis foram fosfato monossódico monohidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), fosfato dissódico dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), acetato de sódio trihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido acético (Chemco, Campinas, Brasil), ácido fosfórico (Labsynth, Diadema, Brasil), dietilamina (Fluka, Buchs, Suíça), ácido trifluoracético (Mallinckrodt Baker, Paris, França) e tris(hidroximetil)aminometano (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA). Para avaliação dos parâmetros que afetam a extração em SPME e LPME e a resolução em CE foram utilizados cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido clorídrico (Mallinckrodt Baker, Paris, França) e hidróxido de sódio (Nuclear, São Paulo, Brasil), todos grau analítico. As ciclodextrinas utilizadas foram: 2-hidroxipropil- β -CD (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e β -CD-sulfatada sódica (Fluka-Biochemika, Buchs, Suíça).

3.1.3- COLUNAS QUIRAIS, COLUNA DE GUARDA E CAPILAR

No modo fase reversa as seguintes colunas quirais foram avaliadas:

☞ Coluna Chiralpak AD-RH[®] (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μ m de diâmetro.

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

Já no modo fase normal foram avaliadas as seguintes colunas:

☞ Coluna Chiralcel OD-H[®] (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

☞ Coluna Chiralpak AD[®] (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

☞ Coluna Chiralpak AD-RH[®] (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

☞ Coluna Chiralpak AS[®] (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída de em derivado de amilose tris [(S)-1-feniletilcarbamato] recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

☞ Coluna Chiralcel OJ[®] (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída de um derivado de celulose tris (4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

☞ Coluna Chiralcel OG[®] (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA), constituída de um derivado de celulose tris (4-metilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

Nos experimentos envolvendo a análise de urina foi empregada a coluna de guarda CN Lichrospher[®] 100 (4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha), constituída de partículas de 5 µm de diâmetro de sílica modificada com grupos cianopropil.

As análises por CE foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não-recoberto, com diâmetro interno de 50 µm, comprimento efetivo de 42 cm e total de 50 cm, obtido da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha).

3.1.4- SOLUÇÕES-PADRÃO DO IBU E DE SEUS METABÓLITOS

As soluções de IBU e de seus metabólitos (*rac*-ibuprofeno, *rac*-2-hidroxiibuprofeno e *rac*-carboxiibuprofeno, gentilmente cedidos pela Knoll Pharmaceuticals, Nottingham,

Inglaterra), foram preparadas separadamente em metanol. Soluções-padrão de IBU nas concentrações de 10, 20, 100, 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero foram obtidas por diluições apropriadas a partir de uma solução estoque de 1 mg mL^{-1} do racemato. Foram preparadas, de forma similar, soluções-padrão dos metabólitos 2-IBUOH e IBUCOOH nas concentrações de 200, 400, 800, 1600 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero à partir de soluções estoque de 5 mg mL^{-1} e 10 mg mL^{-1} , de cada racemato, respectivamente. Todas essas soluções foram utilizadas na otimização das condições de separação dos estereoisômeros nas colunas quirais e no desenvolvimento e validação dos métodos. As soluções foram estocadas em fracos âmbar a -20°C , e assim, permaneceram estáveis por pelo menos seis meses.

3.1.5- SOLUÇÕES-PADRÃO DE HCQ E SEUS METABÓLITOS

As soluções de HCQ, DCQ, DHCQ e BDCQ (substâncias gentilmente fornecidas pela Sanofi/Winthropi Pharmaceuticals, Nova Iorque, EUA) foram preparadas separadamente na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol-água (50 : 50, v/v). Da mesma forma, soluções padrão de HCQ nas concentrações de 2,4, 12, 24, 60, 120 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e DCQ, DHCQ e BDCQ nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidas por diluições apropriadas na mesma mistura de solventes. Essas soluções foram estocadas a -20°C . Todas essas soluções foram utilizadas na otimização das condições de separação, no desenvolvimento e validação dos métodos.

3.1.6- AMOSTRAS DE URINA

Amostras de urina utilizadas durante o desenvolvimento dos métodos foram obtidas de voluntários sadios; as amostras de urina foram armazenadas em tubos de polipropileno, protegidos da luz e sob refrigeração a -20°C até o momento de análise.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS

3.2.1.1- MODO FASE REVERSA

Os componentes aquosos das soluções tipo fase reversa avaliadas na separação quiral dos fármacos foram previamente filtrados em membrana Millipore® 0,45 µm e, após a adição do modificador orgânico, as fases foram degaseificadas durante 15 minutos empregando um aparelho de ultra-som acoplado a um sistema de vácuo. Este procedimento visou à eliminação de gases que pudessem interferir na análise.

3.2.1.2- MODO FASE NORMAL

As soluções tipo fase normal avaliadas na separação quiral dos fármacos foram preparadas por simples mistura dos componentes com posterior homogeneização. Ácido trifluoracético e/ou dietilamina foram adicionados nas fases móveis com o objetivo de melhorar a simetria dos picos.

3.2.2- PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO

As soluções tampão foram preparadas na concentração desejada e, a seguir, o pH era ajustado com adição de ácido (HCl) ou base (NaOH).

3.2.3- AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO QUIRAL POR HPLC

O esquema para otimização da separação dos estereoisômeros do IBU e de seus metabólitos e da HCQ e seus metabólitos por HPLC, empregando colunas no modo fase normal e fase reversa está representado na Figura 14.

O parâmetro avaliado para determinação das condições de separação foi a resolução (R_s). A resolução foi calculada segundo a fórmula (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997):

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Onde t_{R2} é o tempo de retenção para o estereoisômero mais retido e t_{R1} para o menos retido. wb_1 e wb_2 são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente.

A vazão empregada era ajustada conforme a viscosidade da fase móvel a fim de se evitar que a pressão máxima gerada ultrapassasse os limites das respectivas colunas e, ao mesmo tempo, que a análise se tornasse muito demorada.

Figura 14- Esquema para avaliação e otimização da separação por HPLC em colunas quirais. As soluções de partida (³) são sugeridas pelos respectivos fabricantes das colunas quirais e variam de acordo com as características do analito analisado. Modificadores: (¹) etanol, isopropanol; (²) acetonitrila, metanol. Aditivos: (¹) ácido trifluoracético (²) dietilamina.

3.2.4- SEPARAÇÃO QUIRAL DA HCQ E SEUS METABÓLITOS POR CE

A separação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos por CE foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Cardoso, Jabor e Bonato (2006), ligeiramente modificado.

3.2.5- ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ESTEREISÔMEROS DO IBU, 2-IBUOH E IBUCOOH

Após estabelecer as condições de separação, a ordem de eluição dos estereoisômeros do IBU foi determinada analisando-se 25 µL ($n = 3$) de uma solução do estereoisômero (+)-(S)-IBU (99%) - Fluka - Sigma – Aldrich (St. Louis, USA), na coluna

Chiralpak AD-RH[®] e Chiralcel OJ[®] e comparando este tempo de retenção com os tempos de retenção apresentados pelo racemato.

A ordem de eluição dos metabólitos foi avaliada pela análise dos estereoisômeros puros obtidos por separação semipreparativa, nas condições estabelecidas neste trabalho, usando o procedimento descrito por Tan et al (1997c) e comparando os tempos de retenção em cada procedimento.

3.2.6- ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ESTEREOISÔMEROS DA HCQ E SEUS METABÓLITOS

A ordem de eluição da HCQ e seus principais metabólitos por HPLC foi avaliada pela análise dos estereoisômeros puros obtidos por separação semipreparativa, nas condições estabelecidas neste trabalho, usando o procedimento descrito por Cardoso, Jabor e Bonato (2006) e comparando os tempos de retenção e migração em cada procedimento.

3.2.7- PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DO IBU E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS

3.2.7.1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME PARA DETERMINAÇÃO TOTAL DO IBU E SEUS METABÓLITOS (LIVRE + CONJUGADO)

O desenvolvimento e a otimização do procedimento de extração foi realizado de acordo com o esquema mostrado na Figura 15. Foram avaliados os principais parâmetros que pudessem influenciar no processo de extração. A otimização dos parâmetros avaliados foi realizada com amostras de 500 µL de urina humana, em duplicata, fortificadas com solução-padrão de IBU ou de seus metabólitos nas concentrações de 50 e 1000 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero, respectivamente. Para cada parâmetro analisado foi construído um gráfico que representa a quantidade extraída (representada área dos picos nos cromatogramas) frente à modificação empregada.

Amostras de urina foram obtidas de voluntários saudáveis e estocadas a -20°C. Antes do uso, as amostras eram descongeladas à temperatura ambiente (22 ± 2° C) e depois

agitadas por 1 minuto. Alíquotas de 0,5 mL eram transferidas para tubos de 2 mL, fortificadas com 25 µL das soluções-padrão e agitadas em “mixer” por 1 minuto. Feito isso, a hidrólise do ácido glicurônico era feita adicionando-se 100 µL de NaOH 1 mol L⁻¹ (TAN et al., 1997c). A reação de hidrólise ocorria por 1,5 horas à temperatura ambiente (22 ± 2° C). Terminada a hidrólise, as amostras de urina que continham o IBU eram neutralizadas com 200 µL de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹. As amostras que continham os metabólitos eram neutralizadas com 100 µL de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹. Um mL de tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 3,8 era adicionado para manter o fármaco ou seus metabólitos na sua forma neutra durante o período de extração. O pH final das amostras que continham o IBU ficava ao redor de 2,5 - 3 enquanto que nas amostras que continham os metabólitos, o pH final era ao redor de 3,5 – 4.

Figura 15- Esquema para otimização das condições de SPME. ^a As fibras PDMS-DVB, PA, CW-TPR foram utilizadas no desenvolvimento do método para análise do IBU, enquanto que somente as fibras PDMS-DVB e CW-TPR foram utilizadas no desenvolvimento do método para análise dos metabólitos do IBU e da HCQ e seus principais metabólitos. ^b A otimização do pH foi realizada para o método dos metabólitos do IBU e HCQ e seus principais metabólitos. Todo procedimento de otimização foi realizado em duplicata

O procedimento de extração foi feito sob agitação magnética, por imersão direta da fibra nas amostras. Feita a extração, a fibra foi deslocada para dentro da agulha, removida do recipiente de extração e inserida no tubo de dessorção com um volume de 200 μL . Para análise do IBU, o recipiente foi previamente preenchido com a fase móvel e, feita a dessorção, a fibra foi retirada da solução para dentro da agulha e 50 μL dessa solução foram injetados no sistema cromatográfico.

A dessorção dos metabólitos foi feita de forma similar a do IBU, porém, metanol foi o solvente utilizado na dessorção (100 μL). Feita a dessorção, o metanol era evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo dissolvido em 100 μL da fase móvel e 50 μL eram injetados no sistema cromatográfico.

3.2.8- PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DA HCQ E SEUS METABÓLITOS

3.2.8.1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME PARA DETERMINAÇÃO DA HCQ E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS POR HPLC

O desenvolvimento e a otimização do procedimento de extração foram realizados de acordo com o esquema mostrado na Figura 15. Os parâmetros que afetam a extração foram avaliados empregando amostras de 3 mL de urina humana, em duplicata, fortificadas com solução-padrão de HCQ e de seus metabólitos, DCQ e DHCQ, nas concentrações de 1000 e 416 ng mL^{-1} de cada estereoisômero, respectivamente. Para cada parâmetro analisado foi construído um gráfico que representa a quantidade extraída (representada pela área dos picos nos cromatogramas) frente à modificação empregada.

Amostras de urina foram obtidas de voluntários saudáveis e estocadas a -20°C . Antes do uso, as amostras eram descongeladas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e depois agitadas por 1 minuto. Aliquotas de 3 mL eram transferidas para tubos de 4 mL, fortificadas com 25 μL das soluções-padrão e agitadas em “mixer” por 1 minuto. Um mL de tampão

fosfato 1 mol L^{-1} pH 11 era adicionado para manter o fármaco e seus metabólitos na sua forma neutra durante o período de extração. O pH final das amostras ficava ao redor de 10.

3.2.8.2- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE LPME PARA DETERMINAÇÃO DA HCQ E SEUS METABÓLITOS POR CE

O desenvolvimento e a otimização do procedimento de extração foram realizados de acordo com o esquema mostrado na Figura 16, utilizando amostras de 3 mL de urina humana, em triplicata, fortificadas com solução-padrão de HCQ de seus metabólitos, BDCQ, DCQ e DHCQ nas concentrações de 416 e 333 ng mL^{-1} de cada estereoisômero, respectivamente. Para cada parâmetro analisado foi construído um gráfico que representa a quantidade extraída (representada pela área dos picos nos eletroferogramas) frente à modificação empregada.

Antes do uso, as amostras de urina obtidas de voluntários saudáveis e estocadas a -20°C eram descongeladas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e depois agitadas por 1 minuto. Aliquotas de 3 mL eram transferidas para tubos de 4 mL, fortificadas com 25 μL das soluções-padrão e agitadas em “mixer” por 1 minuto. Um mL de água e 250 μL de NaOH 2 mol L^{-1} era adicionado para manter o fármaco ou seus metabólitos na sua forma neutra durante o período de extração.

Figura 16- Esquema para otimização das condições de LPME. Os solventes empregados foram: 1-octanol, acetato de butila, acetato de hexila, acetato de dodecila, éter dibutílico e éter n-hexílico. Todo procedimento de otimização foi realizado em triplicata

3.2.9 -VALIDAÇÃO

A validação dos métodos foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos por algumas agências regulamentadoras (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION e ANVISA) para análise de fármacos em fluidos biológicos. O uso da padronização interna é freqüentemente utilizada em análises cromatográficas, principalmente quando o método envolve algum tipo de extração. Assim, o método para a análise da HCQ e seus metabólitos, empregando SPME e LPME, foi utilizado metoprolol e mirtazapina, respectivamente, como padrão interno. Para análise do ibuprofeno e seus metabólitos a padronização interna não foi necessária pois a curva analítica apresentou valores de coeficiente de variação aceitáveis.

3.2.9.1-CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

No método desenvolvido, as curvas analíticas foram construídas pela análise de amostras de urina (0,5 mL para análise do IBU e seus metabólitos e 3 mL para análise da HCQ e seus metabólitos-duplicata para cada concentração) previamente fortificadas com 25 µL das soluções-padrão de IBU e seus metabólitos e HCQ e seus metabólitos. Obteve-se assim, para análise do IBU e seus metabólitos, as concentrações de 0,25, 0,5, 1, 5, 10 e 25 e de 5, 10, 20, 40, 50 µg de cada estereoisômero por mL de urina, respectivamente. Para análise da HCQ e seus principais metabólitos, por SPME-HPLC, foram usadas as seguintes concentrações, respectivamente, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng e 42, 83, 166, 333 e 416 ng de cada estereoisômero por mL de urina. Para análise da HCQ e seus metabólitos, por LPME-CE, foram empregadas as seguintes concentrações, respectivamente, 10, 50, 100, 500 e 1000 ng e 21, 42, 83, 166 e 333 ng de cada estereoisômero por mL de urina. As urinas fortificadas foram, então, submetidas ao processo de extração.

As áreas dos picos registrados foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. A melhor relação entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Dessa forma, obteve-se uma relação linear (primeira ordem) entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) da substância na amostra, que pode ser expressa pela equação $y = ax + b$, onde "a" é a inclinação da reta e "b" o ponto de interseção da reta com eixo das ordenadas.

3.2.9.2-RECUPERAÇÃO

A recuperação é calculada pela fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração calculada}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

A "concentração calculada" das amostras submetidas ao processo de extração foi obtida empregando-se a curva analítica construída com dados resultantes da análise direta de soluções-padrão, após evaporação do solvente e dissolução na fase móvel. Para avaliar

a recuperação, amostras de urina (triplicata) foram fortificadas com soluções-padrão de IBU de tal forma a obter as concentrações urinárias de 0,5, 5, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero. Para os metabólitos do IBU a recuperação foi feita de maneira semelhante, fortificando amostras de urina com soluções-padrão de 2-IBUOH e IBUCOOH correspondentes a concentrações urinárias de 5, 20, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero. Para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC, as concentrações urinárias foram, respectivamente, de 100, 500 e 1000 e de 83, 166 e 333 ng mL^{-1} , respectivamente. Já, para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE, as concentrações urinárias foram de 50, 500 e 1000 e de 42, 166 e 333 ng mL^{-1} de cada estereoisômero. A "concentração nominal" foi considerada como sendo a concentração teórica usada para fortificar as amostras de urina que seriam submetidas à extração.

3.2.9.3- PRECISÃO E EXATIDÃO

Foram preparadas amostras de 20 mL de urina fortificadas nas concentrações de 0,75, 7,5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 15, 30 e 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero do IBU e de seus metabólitos, respectivamente. Essas amostras de urina foram divididas em alíquotas de 2 mL, condicionadas em tubos âmbar e estocadas sob refrigeração de -20°C até o momento da análise.

Para avaliação da precisão e exatidão da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC, foram preparadas amostras de 50 mL de urina fortificadas nas concentrações de 120, 600 e 960 ng mL^{-1} e 100, 200 e 400 ng mL^{-1} de cada estereoisômero da HCQ e de seus principais metabólitos, respectivamente. Para avaliação da precisão e exatidão da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE, foram preparadas amostras de 50 mL de urina fortificadas nas concentrações de 30, 300 e 600 ng mL^{-1} e 50, 150 e 300 ng mL^{-1} de cada estereoisômero da HCQ e de seus principais metabólitos, respectivamente. Essas amostras de urina foram divididas em alíquotas de 20 mL, condicionadas em tubos âmbar e estocadas sob refrigeração de -20°C até o momento da análise.

3.2.9.3.1- PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-ENSAIO

No caso do IBU e seus metabólitos, a avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio foi realizada analisando-se frações ($n = 10$) de 500 μL de urina, fortificadas nas concentrações de 0,75, 7,5 e 20 e 15, 30 e 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero do IBU e de seus metabólitos, respectivamente. As concentrações foram avaliadas em dias diferentes porém, todas as frações de uma mesma concentração foram analisadas no mesmo dia. Simultaneamente, em cada dia de análise foi construída a curva analítica em duplicata ($n = 2$) do IBU e de seus metabólitos.

A avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC foi realizada analisando-se frações ($n = 5$) de 3 mL de urina, fortificadas nas concentrações de 120, 600 e 960 ng mL^{-1} e 100, 200 e 400 ng mL^{-1} de cada estereoisômero da HCQ e de seus principais metabólitos, respectivamente. Neste caso, todas as frações foram analisadas no mesmo dia. Simultaneamente foi construída uma curva analítica, em duplicata ($n = 2$) da HCQ e de seus metabólitos, respectivamente. Para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE o procedimento foi realizado da mesma maneira descrita acima, porém nas concentrações de 30, 300 e 600 ng mL^{-1} e 50, 150 e 300 ng mL^{-1} de urina de cada estereoisômero da HCQ e de seus metabólitos, respectivamente.

3.2.9.3.2-PRECISÃO E EXATIDÃO INTERENSAIOS

Para avaliação desse parâmetro, amostras de 500 μL de urina fortificadas com IBU e de seus metabólitos, foram analisadas em triplicata, simultaneamente, durante 5 dias consecutivos.

A avaliação da precisão e exatidão interensaio da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC e LPME-CE foi realizada durante 3 dias consecutivos, em quintuplicata.

Novamente, para cada dia de análise, foi feita a curva analítica de modo idêntico ao descrito no experimento de avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio.

3.2.9.4- LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Para a análise do IBU e seus metabólitos, o limite de quantificação foi determinado fortificando amostras de 500 μL de urina ($n = 5$) nas concentrações de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero do IBU e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero de seus metabólitos. As amostras foram submetidas ao processo de SPME e analisadas como descrito anteriormente. Para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC o limite de quantificação foi determinado fortificando amostras de urina nas concentrações de 50 ng mL^{-1} e 83 ng mL^{-1} de cada estereoisômero, respectivamente. Já, para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE o limite de quantificação foi de 10 ng mL^{-1} e 21 ng mL^{-1} de urina de cada estereoisômero, respectivamente. Simultaneamente, foi construída a curva analítica conforme descrito no experimento de avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio.

3.2.9.5- SELETIVIDADE

A interferência de outros fármacos co-administrados foi avaliada analisando-se alíquotas de $25 \mu\text{L}$ de soluções-padrão na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interferentes com tempos de retenção iguais ao analito e que produzam sinais de detecção inferiores a 20% daquele estabelecido para o LQ podem ser tolerados (FDA, 2001).

3.2.9.6- ESTABILIDADE

3.2.9.6.1- ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

A estabilidade do IBU, HCQ e seus metabólitos foi testada durante três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando três amostras das concentrações baixa ($0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o IBU e seus metabólitos, respectivamente e 30 ng mL^{-1} e 50 ng mL^{-1} para HCQ e seus metabólitos, respectivamente) e alta ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o IBU e seus metabólitos, respectivamente, e 600 ng mL^{-1} e 300 ng mL^{-1} para HCQ e seus metabólitos, respectivamente). O estudo foi realizado nas seguintes condições: 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, e assim, sucessivamente, até completar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os valores (área dos picos) foram comparados com valores obtidos de amostras frescas e a análise estatística foi realizada utilizando o Teste t student (programa Origin 5.0), considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2.9.6.2- ESTABILIDADE NO TEMPO E CONDIÇÕES DE ANÁLISE

Para a realização deste teste, foram preparadas três amostras das concentrações baixa e alta, como descrito anteriormente. Cada uma delas foi submetida ao descongelamento natural, à temperatura ambiente e mantida durante 12 horas sob a bancada de trabalho. Após este tempo, as amostras foram quantificadas e novamente os valores foram comparados com valores obtidos de amostras frescas; a análise estatística foi realizada utilizando o Teste t (Origin 5.0), considerando $p \leq 0,05$ sendo estatisticamente significativa.

3.2.9.7-TESTE DE RACEMIZAÇÃO

Foi avaliada a capacidade de ocorrer, durante o processo de SPME, a racemização dos estereoisômeros do IBU e seus metabólitos e da HCQ e seus principais metabólitos nas amostras de urina. Para análise do IBU, alíquotas de 25 μL das soluções-padrão foram secas sob fluxo de ar comprimido para serem dissolvidas em 100 μL da fase móvel e injetadas no sistema cromatográfico no modo normal [coluna: Chiralcel OJ[®], fase móvel: hexano : etanol (98 : 2, v/v) + 0,05% de TFA]. Para os metabólitos do IBU, da HCQ e seus metabólitos, as soluções-padrão foram injetadas no sistema nas condições estabelecidas neste trabalho. Após a resolução dos estereoisômeros, os mesmos foram coletados separadamente em tubos na saída do detector, secos sob fluxo de ar comprimido e dissolvidos em metanol. A seguir, amostras de urina, em triplicada, foram fortificadas, com

50 µL de cada um dos estereoisômeros para serem submetidos a SPME e posterior análise cromatográfica. A inversão de configuração foi avaliada verificando-se o surgimento ou não do pico correspondente ao estereoisômero não adicionado.

3.2.10- APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após o desenvolvimento e validação, os métodos foram aplicados em uma situação real de quantificação estereosseletiva do IBU e seus metabólitos e da HCQ e seus metabólitos em amostras de urina. Para análise do IBU foi administrada uma dose única de 200 mg de IBU (Advil[®], Whitehall, São Paulo, Brasil), pela manhã, após jejum de 8 horas, a um voluntário sadio, do sexo masculino, 25 anos, 82 Kg. Amostras seqüenciais de urina foram coletadas imediatamente antes da administração, e em intervalos de 2 horas até 12 horas. Para análise dos metabólitos, foi administrada uma dose única de 200 mg de IBU (Advil[®], Whitehall, SP, Brasil), pela manhã, após jejum de 8 horas, a um voluntário sadio, do sexo feminino, 25 anos, 60 Kg. Amostras seqüenciais de urina foram coletadas imediatamente antes da administração e nos seguintes intervalos: 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12 e 12-24 horas após administração. As amostras de urina foram coletadas em tubos de polipropileno e o volume de cada intervalo medido. Alíquotas de 2 mL foram armazenadas e sob refrigeração a -20°C e protegidas da luz até o momento de análise. Para análise da HCQ e seus metabólitos por SPME-HPLC e LPME-CE foi administrada uma dose única de 400 mg de HCQ (Plaquinol[®], Sanofi-Synthelabo, Rio de Janeiro, Brasil), pela manhã, após jejum de 8 horas, a um voluntário sadio, do sexo masculino, 27 anos, 82 Kg. Amostras seqüenciais de urina foram coletadas imediatamente antes da administração e nos seguintes intervalos: 0-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-24 e 24-48 h. As amostras de urina foram coletadas em tubos de polipropileno e o volume de cada intervalo foi medido. Alíquotas de 20 mL foram armazenadas e protegidos da luz direta, sob refrigeração a -20°C e protegidas da luz até o momento de análise.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

4.1.1- AVALIAÇÃO DAS COLUNAS QUIRAIS

O objetivo principal nessa etapa foi obter a separação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos (DHCQ e DCQ) e do IBU e seus metabólitos em uma mesma coluna e utilizando a mesma fase móvel. Contudo, para a separação do IBU e seus metabólitos esta tarefa não foi possível com as condições avaliadas. Partiu-se então para a otimização da separação dos metabólitos em uma coluna e do IBU em outra.

Para separação do IBU e seus metabólitos foram avaliadas cinco colunas quirais baseadas em polissacarídeos em eluição no modo normal (Chiralcel OD-H®, Chiralpak AD®, Chiralpak AS®, Chiralcel OJ®, Chiralcel OG®) e duas colunas quirais baseadas em polissacarídeos em eluição no modo reverso (Chiralpak AD-RH®, Chiralcel OJ-R®), de acordo com o esquema apresentado na Figura 14. Na separação da HCQ e seus principais metabólitos foram avaliadas 2 colunas quirais baseadas em polissacarídeos (Chiralpak AD-RH®, Chiralcel OD-H®) em eluição no modo normal, de acordo com o esquema apresentado na Figura 14. Apesar da coluna Chiralpak AD-RH® ser utilizada em modo reverso, a inversão da polaridade foi realizada nessa coluna, utilizando o método descrito por Cass et al., (2003).

4.1.1.1- COLUNA CHIRALCEL OD-H®

A fase estacionária dessa coluna derivada de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) resolve uma variedade de compostos quirais, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, compostos que contém metais, compostos quirais com átomos de enxofre e fósforo, compostos com grupos ciano e carbonila, aminas, ácido carboxílicos, álcoois, derivados de amino ácidos, éteres e diversos fármacos (OKAMOTO; YASHIMA, 1998) incluindo agentes beta-bloqueadores adrenérgicos. O principal sítio de reconhecimento quiral são os resíduos de carbamatos próximos às unidades de glicose. Racematos com grupos polares

provavelmente interagem com os resíduos de carbamatos, principalmente através de ligações de hidrogênio (OKAMOTO; KAIDA, 1994). Nessa coluna, a resolução do IBU não foi possível. Quanto aos metabólitos do IBU, somente o 2-IBUOH pode ser totalmente separado. O metabólito IBUCOOH foi parcialmente separado e quando analisado junto ao 2-IBUOH, eles co-eluíam. Quanto a HCQ e seus principais metabólitos, a separação foi realizada utilizando uma fase móvel composta por hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) e adição de 0,2% de DEA (Figura 17). Metanol não é um solvente freqüentemente utilizado no modo fase normal, contudo quanto maior a quantidade de metanol adicionada melhor era a eficiência. Porém, os tempos de retenção dos analitos não eram reprodutíveis com as fases móveis contendo quantidades maiores do que 4% de metanol. Esse fato pode ser devido a baixa solubilidade do metanol em hexano. Assim, optou-se pelo uso de 2% de metanol na fase móvel e com essa quantidade os tempos de retenção foram reprodutíveis.

Figura 17- Melhor separação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos na coluna Chiralcel OD-H[®]. 1-(-)-(R)-DCQ, 2-(+)-(S)-DCQ, 3-(-)-(R)-HCQ, 4-(+)-(S)-HCQ, 5-(-)-(R)-DHCQ, 6-(+)-(S)-DHCQ. Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min⁻¹; detecção em 343 nm.

4.1.1.2- COLUNA CHIRALPAK AD[®]

Essa fase estacionária derivada de amilose possui o mesmo grupo usado na derivação da celulose da coluna Chiralcel OD-H[®], porém, a estrutura espacial do derivado de amilose é diferente do derivado de celulose, o que leva à diferenças no reconhecimento quiral.

A habilidade dessa coluna para o reconhecimento quiral é tão efetiva quanto da coluna Chiralcel OD-H®, entretanto, alguns estereoisômeros são eluídos em ordem inversa nas 2 fases estacionárias, sugerindo que elas são complementares no reconhecimento quiral. Estereoisômeros não resolvidos na coluna Chiralcel OD-H® podem ser resolvidos na coluna Chiralpak AD®, e vice-versa (YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

Nessa coluna foi possível obter a separação de todos os estereoisômeros dos metabólitos do IBU, mas somente a fase móvel composta pela mistura de ácido trifluoracético 0,05% e hexano : etanol (94 : 6 v/v) foi capaz de produzir a separação desejada (Figura 18). A separação dos estereoisômeros do IBU não foi possível com qualquer fase móvel avaliada.

Figura 18- Melhor separação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU na coluna Chiralpak AD®. IBUCOOH (1) e 2-IBUOH (2). Fase móvel: hexano : etanol (94 : 6 v/v) + 0,05% de TFA; vazão de 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

4.1.1.3- COLUNA CHIRALPAK AS®

A coluna Chiralpak AS® possui como fase estacionária um (S)-derivado de amilose incorporado em sílica que, entre os derivados de arilcarbamatos, freqüentemente mostra a maior habilidade de resolução óptica para uma variedade de compostos (OKAMOTO; KAIDA, 1994). Compostos que possuem grupos carbonilas e não podem ser bem resolvidos em colunas com derivados de fenilcarbamatos têm sido resolvidos nesta coluna. O

reconhecimento quiral depende da natureza e posição dos substituintes no grupo fenil (OKAMOTO; KAIDA, 1994).

Nessa coluna, a separação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU foi possível utilizando-se 0,05% de ácido trifluoracético em uma mistura de hexano : isopropanol (95 : 5 v/v) (Figura 19). A separação dos estereoisômeros do IBU não foi possível com qualquer fase móvel avaliada.

Figura 19- Melhor separação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU na coluna Chiralpak AS®. (+)-(S)-2-IBUOH (1), (-)-(R)-2-IBUOH (2), (2'S,2S)-IBUCOOH (3), (2'R,2S)-IBUCOOH (4), (2'S,2R)-IBUCOOH (5), (2'R,2R)-IBUCOOH (6). Fase móvel: hexano : isopropanol (95 : 5 v/v) + 0,05% de TFA; vazão de 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

4.1.1.4- COLUNA CHIRALCEL OJ®

A fase estacionária da coluna Chiralcel OJ® é constituída por um derivado de celulose tris (4-metilbenzoato) que tem mostrado uma boa habilidade de reconhecimento quiral. Os substituintes metil presentes nesse derivado doam elétrons provocando um efeito indutivo que pode aumentar a densidade eletrônica do oxigênio presente nos grupamentos carbonila, e assim, melhorar a enantiosseletividade da coluna (OKAMOTO; ABURATANI; HATADA, 1987).

Essa coluna tem se mostrado eficiente na separação do ibuprofeno (DUCRET et al., 1998; KANG, KO, CHEONG, 2005). Nessa coluna a separação dos estereoisômeros do IBU foi possível utilizando 0,05% de TFA em uma mistura de hexano : etanol (98 : 2 v/v) (Figura

20). Os estereoisômeros dos metabólitos não foram separados em qualquer condição avaliada.

Figura 20- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU obtida na coluna Chiralcel OJ[®], (-)-(R)-IBU (1) e (+)-(S)-IBU (2). Fase móvel: hexano : etanol (98 : 2 v/v) + 0,05% de TFA; vazão: 1 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

4.1.1.5- COLUNA CHIRALCEL OG[®]

Na coluna Chiralcel OG[®], o sítio chiral é um derivado de celulose tris (4-metilfenilcarbamato) que possui uma estrutura parecida com o seletor chiral coluna Chiralcel OD-H[®], porém com apenas um substituinte metil. Como mencionado anteriormente, substituintes que doam elétrons, como metil, aumentam a densidade eletrônica dos grupamentos carbonila presentes, o que leva a uma maior habilidade de reconhecimento quiral (OKAMOTO; KAIDA, 1994). Nessa coluna, tanto a separação do IBU quanto a separação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU não foi possível com as fases móveis empregadas.

4.1.1.6- COLUNA CHIRALPAK AD-RH[®]

Essa coluna apresenta as mesmas características da coluna Chiralpak AD[®] porém os eluentes utilizados são principalmente, misturas de soluções aquosas : acetonitrila ou soluções aquosas : álcool (TACHIBANA; OHNISHI, 2001). Além disso, o derivado de amilose é incorporado em partículas de sílica de 5 µm, o que resulta em colunas com maior eficiência. No desenvolvimento e otimização do método no modo reverso, é fundamental controlar o comportamento iônico do analito para obter uma boa separação (TACHIBANA;

OHNISHI, 2001). Um analito ionizado tem a interação com a fase estacionária reduzida consideravelmente, presumivelmente porque a sua solvatação inibe a interação direta com a fase estacionária, o que resulta em uma separação pobre. Para evitar esse problema duas alternativas podem ser seguidas. A primeira envolve a supressão da dissociação do analito pela otimização do pH e a segunda envolve a formação de par iônico do analito com um reagente iônico adicionado na fase móvel (TACHIBANA; OHNISHI, 2001).

O esquema apresentado na Figura 14 foi empregado para otimizar a separação na coluna Chiralpak AD-RH[®]. A separação do IBU foi possível utilizando metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v) (Figura 21A) e acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 2,3 (42 : 58 v/v) (Figura 21B). Essa coluna havia sido usada em nosso grupo, recentemente, para o desenvolvimento de um método de separação dos metabólitos (DHCQ e DCQ) da hidroxicloroquina no modo normal (CARDOSO, BONATO, 2005). Porém, ao tentarmos reproduzir o método, a separação não foi mais possível. A explicação mais plausível para esse comportamento é a alteração da enantiosseletividade da coluna, devido a sua utilização em condições bastante diversas (modo polar orgânico e diferentes modificadores) no intervalo de tempo decorrido entre os dois trabalhos desenvolvidos.

Figura 21- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU na coluna Chiralpak AD-RH[®]. (A) Fase móvel: metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v) vazão: 0,45 mL min⁻¹; (B) Fase móvel acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 2,3 (42 : 58 v/v) vazão : 0,5 mL min⁻¹; detecção em 230 nm. 1-(-)-(R)-IBU, 2-(+)-(S)-IBU.

4.1.1.7- COLUNA CHIRALCEL OJ-R®

A coluna Chiralcel OJ-R® apresenta as mesmas propriedades da coluna Chiralcel OJ® e todas as considerações relacionadas a eluição em modo reverso mencionadas anteriormente podem ser seguidas para essa coluna. Somente os estereoisômeros do IBU foram separados nessa coluna, utilizando acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3,5 (40 : 60 v/v) (Figura 22). Em qualquer condição avaliada não foi possível obter a separação parcial ou total dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU.

Figura 22- Melhor separação dos estereoisômeros do IBU na coluna Chiralcel OJ-R®. Estereoisômero 1 (1) e estereoisômero 2 (2). Fase móvel: acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3,5 (40 : 60 v/v); vazão de 0,5 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

4.1.1.8- COMPARAÇÃO DAS COLUNAS QUIRAIS

Os parâmetros apresentados pelas colunas quirais avaliadas nas condições que resultaram nas melhores separações dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU, dos estereoisômeros do IBU, da HCQ e seus principais metabólitos estão listados nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Como mencionado anteriormente, foi possível apenas obter a separação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em uma coluna e dos estereoisômeros do IBU em outra. A análise dos parâmetros avaliados demonstrou que as colunas Chiralpak AD® e Chiralpak AS® foram eficientes nas separações dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU. A coluna Chiralpak AD® apresentou um valor de resolução (R_s) muito baixo ($R_{s2} = 0,8$) (Tabela 6), o que impediu o seu uso. A coluna Chiralpak AS® apresentou picos simétricos,

valores de R_s adequados para todos os picos e tempos de retenção inferiores aos apresentados pela coluna Chiralpak AD[®]. Portanto, a coluna Chiralpak AS[®] foi escolhida para estudos posteriores.

Quanto à análise dos estereoisômeros do IBU, as colunas Chiralpak AD-RH[®], Chiralcel OJ-R[®] e Chiralcel OJ[®] foram eficientes na separação. Porém, para minimizar o uso de solventes orgânicos, a escolha ficou entre as colunas Chiralpak AD-RH[®] e Chiralcel OJ-R[®]. Comparando os dados da Tabela 7, a coluna Chiralpak AD-RH[®] usada com a fase móvel metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v) foi escolhida pois apresentou tempos de retenção inferiores. Quanto à R_s , ambas colunas apresentaram valores próximos (Tabela 7).

Já na separação da HCQ e seus metabólitos, somente a coluna Chiralcel OD-H[®] apresentou a separação desejada (Tabela 8). Essa coluna apresentou tempos de retenção pequenos, R_s aceitável e excelente simetria dos picos.

Assim, a coluna Chiralpak AD-RH[®] e Chiralpak AS[®] foram escolhidas para o desenvolvimento do método para a análise do IBU e seus metabólitos, respectivamente. Da mesma forma, a coluna Chiralcel OD-H[®] foi escolhida para o desenvolvimento do método de análise da HCQ e seus metabólitos.

Tabela 6- Comparação dos resultados obtidos com as colunas Chiralpak AD[®] e Chiralpak AS[®].

Estereoisômeros (2-IBUOH e IBUCOOH)									
Coluna	Fase móvel	V	t_R (min)	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_{s4}	R_{s5}	
Chiralpak AD [®]	Hexano : etanol (96 : 4 v/v) + 0,05% de TFA	1,2	35,5	2,8	0,8	2,8	1,2	3,5	
Chiralpak AS [®]	Hexano: isopropanol (95:5 v/v) + 0,05 % de TFA	1,2	24,4	1,8	1,8	1,3	1,4	1,8	

t_R : tempo de retenção do último composto a eluir; R_s : resolução entre picos adjacentes; V: vazão (mL min⁻¹).

Tabela 7- Comparação dos resultados obtidos com as colunas Chiralpak AD-RH[®], Chiralcel OJ-R[®] e Chiralcel OJ[®].

Estereoisômeros do IBU				
Coluna	Fase móvel	V	t _R (min)	R _s
Chiralpak AD-RH [®]	Acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L ⁻¹ pH 2,3 (42 : 58 v/v)	0,5	18,8	1,6
Chiralpak AD-RH [®]	Metanol : tampão fosfato 100 mmol L ⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v)	0,45	13,9	1,5
Chiralcel OJ-R [®]	Acetonitrila : tampão fosfato 100 mmol L ⁻¹ pH 3,5 (40 : 60 v/v);	0,5	22,4	1,5
Chiralcel OJ [®]	Hexano : etanol (98 : 2 v/v) + 0,05% de TFA	1	11,3	1,3

t_R: tempo de retenção do último composto a eluir; R_s: resolução entre picos adjacentes; V: Vazão (mL min⁻¹).

Tabela 8- Valores de R_s para a separação da HCQ e seus principais metabólitos

Estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos								
Coluna	Fase móvel	V	t _R (min)	R _{s1}	R _{s2}	R _{s3}	R _{s4}	R _{s5}
Chiralcel OD-H [®]	Hexano: etanol: metanol (96 : 2 : 2 v/v) + 0,2% de DEA	1,3	17,7	0,7	1,6	1,0	3,4	0,9

t_R: tempo de retenção do último composto a eluir; R_s: resolução entre picos adjacentes; V: Vazão (mL min⁻¹).

4.1.1.9- ALTERAÇÃO NA CONSTITUIÇÃO DA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DO IBU

Durante a otimização do processo de extração do IBU, verificou-se que, em todas as amostras de urina analisadas havia 2 interferentes nos exatos tempos de retenção dos estereoisômeros do IBU. Após a análise de diversas amostras, pensou-se na possibilidade de que o tampão da fase móvel estaria precipitando o IBU, causando o fenômeno conhecido como “carryover”. Procurou-se então diminuir a concentração do tampão porém, mesmo com a concentração de 10 mmol L⁻¹ de tampão fosfato, o problema ainda persistia. Baseado no trabalho de Bonato, Del lama e De Carvalho (2003), que desenvolveram uma metodologia para análise do ibuprofeno por LC-MS, utilizando solução aquosa de ácido fosfórico na fase móvel, resolveu-se então utilizar como fase móvel metanol : solução

aquosa de ácido fosfórico pH 3 na mesma proporção que estava sendo usada com o tampão, deixando de utilizar o tampão fosfato. Com isso, a separação dos estereoisômeros do IBU não foi significativamente alterada e o problema de interferentes foi resolvido (Figura 23).

Figura 23- Cromatogramas do IBU na coluna Chiralpak AD-RH®. (A)-Fase móvel: metanol : tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 (75 : 25 v/v). (B)-Fase móvel : metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v), vazão: 0,45 mL min⁻¹, detecção em 230 nm. 1-(-)-(R)-IBU, 2-(+)-(S)-IBU.

4.1.1.10- ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ESTEREOISÔMEROS DO IBU E DE SEUS METABÓLITOS

A ordem de eluição foi estabelecida para os estereoisômeros do IBU nas colunas Chiralpak AD-RH® e Chiralcel OJ®. A análise de alíquotas de 50 µL da solução de (+)-(S)-IBU demonstrou que, o primeiro pico corresponde ao (-)-(R)-IBU e o segundo ao (+)-(S)-IBU. A ordem de eluição dos metabólitos do IBU foi estabelecida na coluna Chiralpak AS®. Os estereoisômeros puros (obtidos por análise semipreparativa nas condições estabelecidas no presente trabalho) foram avaliados usando o procedimento descrito por Tan et al., (1997c). Nas condições estabelecidas no presente trabalho houve mudança na ordem de eluição dos metabólitos sendo que o primeiro pico correspondente ao (+)-(S)-IBUOH, o segundo ao (-)-(R)-IBUOH, o terceiro ao (2`S,2S)-IBUCOOH, o quarto ao (2`R,2S)-IBUCOOH, o quinto ao (2`S,2R)-IBUCOOH e o sexto pico ao (2`R,2R)-IBUCOOH.

4.1.1.11- ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ESTEREOISÔMEROS DA HCQ E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS

Os estereoisômeros puros (obtidos por análise semipreparativa nas condições estabelecidas no presente trabalho) foram avaliados usando o procedimento descrito por Cardoso e Bonato (2005). As condições estabelecidas no presente trabalho mostraram a mesma ordem de eluição. Assim, o primeiro pico correspondente ao (-)-(R)-DCQ, o segundo ao (+)-(S)-DCQ, o terceiro ao (-)-(R)-HCQ, o quarto ao (+)-(S)-HCQ, o quinto ao (-)-(R)-DHCQ e o sexto ao (+)-(S)-DHCQ.

4.1.2- SEPARAÇÃO DOS ESTEREOISÔMEROS DA HCQ E METABÓLITOS POR CE

A separação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos por CE foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Cardoso, Jabor e Bonato (2006), ligeiramente modificado. O tampão de análise foi tampão tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol L⁻¹ (pH ajustado para 9 com ácido fosfórico) contendo 1% de β -CD-sulfatada sódica e 30 mg mL⁻¹ de HP- β -CD. Foi empregado um capilar de sílica fundida não-recoberto de 50 μ m de diâmetro interno, 50 cm de comprimento total e 42 cm de comprimento efetivo. A temperatura de análise foi de 20 °C. O comprimento de onda utilizado foi de 343 nm ao invés de 220 nm (esse comprimento de onda foi utilizado somente para a monitorização do padrão interno). Essa mudança no comprimento de onda foi necessária devido a diversos interferentes endógenos que estavam presentes nos tempos de migração da HCQ e seus metabólitos quando se deu início aos experimentos de extração. As amostras foram injetadas por 30 segundos com uma pressão de 50 mbar (ao invés de 15 segundos a uma pressão 50 mbar proposto pelo método original). Esse aumento no tempo de injeção foi necessário para que a detectabilidade do método não fosse prejudicada. A voltagem foi aumentada de +13 kV para +18 kV, resultando em uma corrente de aproximadamente 28 μ A. Com essas modificações, os tempos de migração diminuíram, com o último estereoisômero migrando em menos de 10 minutos, sem diminuição da resolução. O

condicionamento do capilar foi realizado de acordo com o proposto pelos autores (Quadro 1) e a cada 3 injeções todas as soluções (NaOH, água, TP, TP + CD) eram substituídas por soluções novas. Esse procedimento foi essencial para manter a reprodutibilidade dos tempos de migração dos compostos. A Figura 24 mostra o eletroferograma após as modificações.

Quadro 1- Procedimento de lavagem do capilar nas análises por CE

Início do dia	
➤	Lavagem do capilar com NaOH 100 mmol L ⁻¹ durante 10 minutos
➤	Lavagem com água durante 10 minutos
➤	Aplicação de voltagem durante 10 minutos com o tampão de análise
Lavagem entre as análises	
➤	3 minutos com NaOH 100 mmol L ⁻¹
➤	2 minutos com água
➤	3 minutos com o tampão de análise
Final do dia	
➤	10 minutos com NaOH 100 mmol L ⁻¹
➤	5 minutos com água

Figura 24 - Eletroferograma da HCQ e seus metabólitos após modificação do método. Tampão de análise: tampão tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol L⁻¹ pH ajustado para 9 com ácido fosfórico contendo 1% de β-CD-sulfatada sódica e 30 mg mL⁻¹ de HP-β-CD. Capilar de sílica fundida não-recoberto de 50 μm de diâmetro interno, 50 cm de comprimento total e 42cm de comprimento efetivo, temperatura de análise 20 °C, voltagem aplicada: +18 kV, Injeção hidrodinâmica: 50 mbar durante 30 segundos. 1-(-)-(R)-HCQ, 2-(+)-(S)-HCQ 3-(-)-(R)-DHCQ, 4- (+)-(S)-DHCQ, 5-(-)-(R)-DCQ, 6-(-)-(R)-BDCQ, 7-(+)-(S)-DCQ and 8-(+)-(S)-BDCQ, detecção em 343 nm.

4.2- ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DO IBU E SEUS METABÓLITOS E DA HCQ E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS EM URINA EMPREGANDO SPME

4.2.1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SPME

SPME é uma técnica na qual os analitos presentes na amostra são extraídos por um polímero que recobre uma fina fibra de sílica fundida (LORD, PAWLISZYN, 2000). O processo de extração obedece a regra de equilíbrio líquido-líquido:

$$\text{analito}_{\text{matriz}} \xrightleftharpoons{K^{\text{fw}}} \text{analito}_{\text{fibra}}$$

$$K^{\text{fw}} = \frac{C_f}{C_m}$$

Onde, K^{fw} é a constante de equilíbrio líquido-líquido, C_f é a concentração do analito na fibra no equilíbrio e C_m é a concentração do analito na matriz aquosa no equilíbrio (ULRICH, 2000). Portanto, como pode ser visto pela equação acima, quanto maior o K^{fw} , maior será a concentração do analito na fibra e, portanto, maior a recuperação. A variação de algumas características da matriz (pH, força iônica, temperatura) e da fibra (tipo e espessura do polímero) deslocam esse equilíbrio em um dos sentidos, aumentando ou diminuindo a quantidade extraída (LORD, PAWLISLYN, 2000).

4.2.1.1- ESCOLHA DA FIBRA DE EXTRAÇÃO

A escolha da fibra de extração é feita seguindo duas regras simples. Primeiro, a polaridade do polímero e do analito devem ser próximas, de acordo com o conceito de que “similar atrai similar”. O valor de K^{fw} é esperado ser alto para polímeros e analitos apolares. O número de grupos que formam ligações de hidrogênio é uma propriedade especial dos analitos. Esses grupos determinam principalmente a hidrofobicidade do analito e, portanto, também sua afinidade para a fibra (ULRICH, 2000). Uma segunda regra para escolha da fibra é que o polímero deve ser resistente a diversas condições químicas (pH, sal, aditivos) e físicas (alta temperatura). As fibras avaliadas neste trabalho para extração dos

estereoisômeros do IBU e de seus metabólitos e HCQ e seus metabólitos apresentam a seguinte ordem de polaridade: PA > CW-TPR > PDMS-DVB (CHANG, SUNG, HUANG, 2003).

PA é um líquido polar que extraí os analitos principalmente através de processos de absorção (KUMAZAWA et al., 2003), e a fibra desse material vem sendo utilizada para extração de compostos polares, como fenóis (THEODORIDIS et al., 2000, ALPENDURADA, 2000). CW-TPR e PDMS-DVB são fibras mistas e apresentam propriedades intermediárias entre polares e apolares (ALPENDURADA, 2000). Nestas fibras a fase extratora primária é um sólido poroso, portanto, o principal mecanismo de extração é através de processos de adsorção (KUMAZAWA et al., 2003).

Em SPME, a espessura da camada do polímero é o principal fator determinante do volume do adsorvente e a quantidade de analito extraída (n_s) está relacionada com o volume do polímero (V_s) pela fórmula:

$$n_s = \frac{K^{fw} \cdot V_s \cdot V_{aq} \cdot C_m}{K^{fw} \cdot V_s + V_{aq}}$$

Onde V_{aq} é o volume da matriz (LOUCH; MOTHAGH; PAWLISZYN, 1992). Dessa forma, fibras mais espessas extraem maiores quantidades do analito. Para as fibras analisadas, o volume do polímero extrator segue a ordem PA 80 μm > PDMS-DVB 60 μm > CW-TPR 50 μm (SUPELCO, 1999).

A eficiência na extração (representada pela média das áreas dos picos nos cromatogramas) dos estereoisômeros do IBU é mostrada na Figura 25. A fibra CW-TPR mostrou uma eficiência maior na recuperação do IBU, seguida pela fibra PDMS-DVB. A fibra recoberta pelo polímero de poliacrilato mostrou menor capacidade de recuperação dos estereoisômeros do IBU. Inicialmente, a escolha deveria recair sobre a fibra recoberta pelo polímero CW-TPR porém, o seu uso foi descartado devido a informações da literatura que não recomendavam o seu emprego em pH menor que 5 (LIN; SUNG; HUANG, 2003). Também, estudos feitos por Sarrión et al (2002) na determinação de clorofenóis usando

SPME mostraram que, em pH de 2,5, o polímero CW-TPR poderia ser degradado. Portanto, essa fibra não poderia ser usada no método já que o pH das amostras de urina eram ajustadas para um valor em torno de 2,5. Assim, a fibra coberta pelo polímero PDMS-DVB foi utilizada para o desenvolvimento do método, pois apresentou uma resistência mecânica maior e pode ser utilizada em uma ampla faixa de pH (entre 2 e 9) (LIN; SUNG; HUANG, 2003; CHANG; SUNG; HUANG, 2003). A eficiência de extração dos metabólitos do IBU é mostrada na Figura 26. Como era esperado, a recuperação dos metabólitos foi maior na fibra CW-TPR, pois os metabólitos são moléculas altamente polares e, assim, são melhores extraídos nesta fibra que também é polar. Portanto, a fibra recoberta pelo polímero CW-TPR foi utilizada para desenvolver o método de análise dos metabólitos do IBU. Nesse método, o pH das amostras era ajustado para 3,5 – 4. Apesar do baixo pH, o método se manteve reprodutível e somente uma única fibra foi utilizada durante todo o desenvolvimento do método. Um fato observado durante essa etapa, para a fibra de poliacrilato, é sua baixa resistência perante os solventes orgânicos. Durante o processo de dessorção o polímero desprende-se facilmente do suporte de sílica após, aproximadamente, 5 extrações. Apesar do catálogo da Supelco dizer que fibras “ligadas” (como é o caso da fibra de poliacrilato) são estáveis perante solvente orgânicos polares, essa característica não foi observada pelos nossos estudos.

Para análise da HCQ e seus metabólitos, foram avaliadas 2 fibras, uma a base de PDMS-DVB 60 μm e outra a base de CW-TPR 50 μm . Inicialmente era esperado que a fibra CW-TPR apresentasse uma eficiência maior na extração desses compostos, já que são moléculas polares. Contudo, a fibra PDMS-DVB foi muito superior na extração desses compostos em relação a fibra CW-TPR (Figura 27). Esse fato provavelmente se deve a maior espessura da fibra de PDMS-DVB (60 μm) em relação a CW-TPR (50 μm). Como mencionado anteriormente, fibras mais espessas podem extrair quantidades maiores de analitos.

Figura 25- Comparação da eficiência de extração do IBU entre as fibras PDMS-DVB, PA e CW-TPR. Extração: 30 minutos a 25°C; NaCl 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25°C. Conc. 1,25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

Figura 26- Comparação da eficiência de extração dos metabólitos do IBU entre as fibras PDMS-DVB e CW-TPR. Extração: 30 minutos a 25°C; NaCl 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) a 25°C por 3 minutos. Conc. 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

Figura 27- Comparação da eficiência de extração dos metabólitos da HCQ e seus metabólitos entre as fibras PDMS-DVB e CW-TPR. Extração: 40 minutos a 25°C; NaCl 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) a 25°C por 5 minutos. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. n = 2.

4.2.1.2- TEMPO DE EXTRAÇÃO

O transporte de analitos da matriz para a fibra começa logo que entram em contato. Tipicamente, a extração é considerada completa quando é atingido o equilíbrio de distribuição entre o analito presente na amostra e o polímero da fibra. Na prática, isso significa que, quando o equilíbrio é alcançado, a quantidade extraída é constante, independente do aumento do tempo de extração. O tempo de extração pode ser definido como:

$$t_e = \frac{3 \cdot \delta K^{fw} (r_o - r_i)}{D_w}$$

Onde t_e é o tempo de equilíbrio, r_o o raio externo da fibra, r_i o raio interno, δ é a camada estática formada ao redor da fibra durante a agitação, e D_w o coeficiente de difusão do analito na matriz. Portanto, de acordo com a expressão acima, o tempo para que o equilíbrio seja atingido será maior com o aumento do K^{fw} , maior espessura da fibra ($r_o - r_i$) e menor coeficiente de difusão (D_w) do analito na amostra (ULRICH, 2000).

A Figura 28 mostra os resultados obtidos para a extração dos estereoisômeros do IBU no tempo estudado. A quantidade extraída do analito aumenta progressivamente com o aumento do tempo de extração. No período estudado (60 min), o equilíbrio não foi atingido para ambos estereoisômeros. Longos tempos de extração também têm sido requeridos para atingir o equilíbrio com a fibra PDMS-DVB para outros tipos de analitos (LORD, PAWLISZYN, 1997; CHANG; SUNG; HUANG, 2003; HUANG; HUANG; SUNG, 2004). A presença do material polimérico poroso como DVB não somente resulta em uma grande área de superfície, mas também alonga a distância que o analito tem que percorrer para difundir-se através dos poros, levando assim ao aumento do tempo para atingir o equilíbrio (MONTEIL-RIVERA et al., 2004). Na análise dos metabólitos do IBU, cujos resultados são mostrado na Figura 29, o equilíbrio é alcançado para os estereoisômeros do 2-IBUOH a partir de 30 minutos, enquanto que para os estereoisômeros do IBUCOOH, o equilíbrio é alcançado a partir de 45 minutos. Na análise da HCQ e seus principais metabólitos (Figura 30), o equilíbrio não é atingido para qualquer um dos estereoisômeros no tempo estudado (80 minutos).

A extração pode ser realizada sem necessariamente atingir o equilíbrio, desde que as condições de agitação, tempo e temperatura permaneçam constantes (LORD, PAWLISZYN, 2000), e para isso é preciso um controle rigoroso do sistema. Como estamos propondo um método manual de extração, o tempo total (extração, dessorção e análise) não deve ser muito longo. Dessa forma, para os experimentos subseqüentes foi empregado 30 minutos como tempo de extração para análise do IBU e seus metabólitos e 40 minutos para análise da HCQ e seus principais metabólitos.

Figura 28- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25°C. Conc. 1,25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero; Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

Figura 29- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25°C. Conc.: 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

Figura 30- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: a 25°C; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25°C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

4.2.1.3- ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO

O efeito da adição de cloreto de sódio na extração dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos e do IBU e de seus metabólitos foi estudado preparando amostras com concentrações entre 0 a 30% (m/v) do sal. Os estudos mostraram que a partir da concentração 20% (m/v) de NaCl adicionado, a recuperação dos estereoisômeros do IBU começa a diminuir (Figura 31). Quanto aos metabólitos do IBU, o mesmo foi observado para o IBUCOOH. Porém, a recuperação do 2-IBUOH continua a aumentar com 30% (m/v) de NaCl adicionado (Figura 32). Quanto a análise da HCQ e seus metabólitos, a recuperação dos estereoisômeros aumenta até 10% (m/v) de NaCl (exceto para os estereoisômeros da DHCQ, cujo a recuperação aumenta até 20% (m/v) de NaCl adicionado. A partir de então a recuperação começar a diminuir (Figura 33). A relação entre K^{fw} e a concentração de sal (C_s) pode ser expressa pela equação:

$$\frac{\ln K^{fw}}{K_o^{fw}} = K_s \cdot C_s$$

Onde, K_o^{fw} é K^{fw} na $C_s = 0$ e K_s é uma constante específica (ULRICH, 2000). Como pode ser visto, o aumento na concentração do sal pode aumentar a recuperação pois aumenta o K^{fw} . A adição de sal em amostras aquosas pode diminuir a solubilidade de compostos orgânicos, o que leva a um aumento na recuperação; este efeito é conhecido como “salting out” (ULRICH, 2000). Por outro lado, altas concentrações salinas podem provocar precipitação do fármaco, além de formar uma camada iônica em volta da fibra, o que causa a repulsão de analitos carregados com a mesma carga (REUBSAET et al., 1998). Pode também aumentar a viscosidade do meio, reduzindo a velocidade de difusão dos analitos para a fibra (LEE et al., 1997). O resultado negativo obtido para o IBU e IBUCOOH e HCQ e seus principais metabólitos em concentrações superiores a 20% pode ser explicado também pelo processo de interação de moléculas polares do analito com os íons da solução, reduzindo sua migração para a fibra (LORD, PAWLISZYN, 2000). A solução inicial já continha uma grande quantidade de sal, pois no processo de extração era adicionado 1 mL de tampão fosfato 1 mol L^{-1} . A concentração de NaCl foi mantida em 10% (m/v) para os experimentos subsequentes de análise do IBU e da HCQ e seus principais metabólitos e 20% (m/v) para análise dos metabólitos do IBU.

Figura 31- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25°C ; dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25°C . Conc.: $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. $n = 2$.

Figura 32- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25°C; dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25°C. Conc.: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

Figura 33- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos a 25°C; dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25°C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL^{-1} e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL^{-1} de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

4.2.1.4- TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

A temperatura afeta a extração de duas diferentes formas quando a SPME é feita por extração direta, como nesse estudo. O aumento na temperatura de extração aumenta o coeficiente de difusão do analito na amostra e reduz a resistência à transferência de massa,

o que leva a um aumento na recuperação. Por outro lado, adsorção é um processo exotérmico, assim, o aumento da temperatura reduz a constante de distribuição do analito e sua recuperação (ALPENDURADA, 2000). O efeito da temperatura na extração pode ser expresso pela seguinte equação:

$$\frac{\ln K^{\text{fw}}}{K_o^{\text{fw}}} = -\Delta G^{\text{fw}} \cdot (1/T - 1/T_o)$$

Onde, T_o é a temperatura inicial, T a temperatura final, K_o^{fw} é a constante de equilíbrio na temperatura inicial (T_o) e ΔG^{fw} é a entalpia da transferência do analito entre 2 fases (ULRICH, 2000). As Figuras 34, 35 e 36 mostram o efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros do IBU, seus metabólitos e da HCQ e seus principais metabólitos, respectivamente. O aumento da temperatura na extração levou a um aumento na recuperação dos estereoisômeros do IBU, provavelmente pela redução de transferência de massa e aumento do coeficiente de difusão do analito no meio (Figura 34). Embora 60 °C seja a temperatura ideal para extração, essa condição era difícil de ser mantida e controlada e, como o estudo não está sendo realizado em condições de equilíbrio, qualquer variável pode comprometer os resultados. Portanto, a temperatura para os estudos subsequentes no método do IBU foi mantida em 25 °C. Quanto aos metabólitos do IBU e a HCQ e seus principais metabólitos, os 2 efeitos mencionados foram observados (Figuras 35 e 36). As recuperações dos estereoisômeros do IBUCOOH diminuíram ligeiramente com o aumento da temperatura de 25 para 60 °C. Provavelmente, o efeito termodinâmico tem um papel mais importante sob essas condições devido à diminuição da constante de distribuição. Por outro lado, a eficiência na extração dos estereoisômeros do 2-IBUOH aumenta ligeiramente com o aumento da temperatura. Nesse caso, o efeito cinético tem um papel maior na extração devido à diminuição da resistência de transferência de massa e aumento do coeficiente de difusão do analito. Na análise da HCQ e seus principais metabólitos, um efeito semelhante é observado. Para DCQ e HCQ o aumento na temperatura leva a um aumento na recuperação. Contudo, para DHCQ até 40°C ocorre um aumento na

recuperação e a partir de então a recuperação diminui (Figura 36). Esses diferentes efeitos com a variação da temperatura foram observados por outros autores com diferentes analitos (CHANG; SUNG; HUANG, 2003; HUANG; HUANG; SUNG, 2004). Para os experimentos subsequentes na análise dos metabólitos do IBU e da HCQ e seus metabólitos a temperatura foi mantida em 25 °C pelos mesmos motivos descritos para o IBU anteriormente.

Figura 34- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros do IBU em urina. Extração: 30 minutos; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25 v/v) por 5 minutos a 25 °C. Conc.: 1,25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

Figura 35- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos; NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25°C. Conc.: 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

Figura 36- Efeito da temperatura na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos; NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25°C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

4.2.1.5- CONTROLE DO PH

O pH da extração é importante para fármacos que possuem grupos dissociáveis que são pH dependentes, já que, somente a forma não dissociada será extraída pelos processos de absorção (LORD, PAWLISZYN, 2000). O uso do tampão é importante, pois enquanto controla o pH da solução, as formas não-dissociadas do fármaco são extraídas, isso desloca o equilíbrio da reação e faz com que se formem mais formas não-dissociadas que, assim, ficam disponíveis para extração (LORD, PAWLISZYN, 2000). Sendo o IBU um ácido fraco, com pKa de 3,8, o pH da solução foi controlado adicionando 1 mL de tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 3,8 nas amostras de urina, resultando em pH final de 2,5 – 3,0. Como não se conhecia os pKas dos metabólitos do IBU e dos metabólitos da HCQ, o processo foi otimizado conforme mostram as Figuras 37 e 38. Na análise dos metabólitos do IBU, o aumento do pH leva a um decréscimo na recuperação dos metabólitos, pois a quantidade de formas dissociadas aumenta, resultando em moléculas mais hidrofílicas, com baixa afinidade pela fibra. O contrário é observado com a HCQ e seus principais metabólitos. O decréscimo no pH resulta em uma diminuição da recuperação pelo mesmo motivo descrito

anteriormente. O pH foi mantido em 3,5 – 4 para as subseqüentes extrações dos metabólitos do IBU e em 10 para subseqüentes extrações da HCQ e seus metabólitos. Apesar de haver uma ligeira melhora na recuperação da DCQ em pH 12, esse pH não foi utilizado, pois a fibra poderia ser degradada mais rapidamente, já que estaria sendo utilizada em seu limite de pH máximo (SUPELCO, 1999).

Figura 37- Efeito da variação do pH na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU em urina. Extração: 30 minutos a 25 °C, NaCl: 20% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 3 minutos a 25 °C. Conc.: 25 µg mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: CW-TPR. n = 2.

Figura 38- Efeito da variação do pH na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos em urina. Extração: 40 minutos a 25 °C, NaCl: 10% (m/v), dessorção: metanol (100%) por 5 minutos a 25 °C. Conc.: (HCQ) 1000 ng mL⁻¹ e (DCQ e DHCQ) 416 ng mL⁻¹ de cada estereoisômero. Fibra: PDMS-DVB. n = 2.

4.2.1.6- PERÍODO DE DESSORÇÃO E “CARRYOVER”

O efeito do período de dessorção (tempo em que a fibra é exposta ao solvente de dessorção) e “carryover” (quantidade do analito que pode ter ficado na fibra após a dessorção) foram estudados. O aumento no tempo de dessorção não resultou em diferença significativa na recuperação dos estereoisômeros do IBU e de seus metabólitos, mostrando que os analitos são rapidamente dessorvidos da fibra. Contudo, quando o “carryover” foi estudado no mesmo tempo, nenhum ou pouco (1,2% ou menos para ambos estereoisômeros do IBU) “carryover” foi observado somente após 5 minutos de dessorção. Quanto aos metabólitos do IBU, “carryover” não foi observado em qualquer tempo analisado. Este fato se deve, provavelmente, ao solvente usado (metanol 100%) que solubiliza totalmente os analitos no momento da dessorção, evitando assim o “carryover”. O tempo de dessorção foi mantido em 5 minutos e 3 minutos para os experimentos subseqüentes na análise do IBU e seus metabólitos, respectivamente. Na análise da HCQ e seus principais metabólitos, a variação no tempo de dessorção não mostrou diferença significativa na recuperação dos analitos e “carryover” foi observado somente para DCQ quando o tempo de dessorção era de 1 minuto. Assim, o tempo de dessorção foi mantido em 3 minutos para os subseqüentes experimentos para HCQ e seus principais metabólitos.

“Carryover” em SPME não é um motivo de grande preocupação como em outros métodos, já que se trata de um processo de equilíbrio. “Carryover” pode ser um problema somente quando a concentração do analito na amostra seguinte é tão baixa que o equilíbrio na fibra é menor do que a concentração causada por “carryover” de análises anteriores (GORECKI, PAWLISZYN, 1995). Quando amostras de diferentes concentrações são analisadas em seqüência, é recomendável que a fibra seja condicionada por uma segunda etapa de dessorção.

4.2.2- CONDIÇÕES OTIMIZADAS DA SPME

Os quadros 2, 3 e 4 mostram as condições otimizadas na SPME na análise do IBU, metabólitos do IBU e HCQ e seus principais metabólitos, respectivamente.

Quadro 2- Condições para extração do IBU por SPME

<u>CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA EXTRAÇÃO DO IBU</u>	
Extração	Dessorção
✓ Volume de urina: 500 µL	✓ Tempo de dessorção: 5 minutos
✓ Tempo de extração: 30 minutos	✓ Solvente de dessorção: fase móvel
✓ Fibra: PDMS-DVB 60 µm	✓ Volume de solvente de dessorção: 200 µL
✓ Tampão fosfato 1 mol L ⁻¹ pH 3,8: 1 mL	✓ Temperatura: 25° C
✓ Cloreto de sódio: 10% (m/v)	
✓ Temperatura: 25° C	

Quadro 3- Condições para extração dos metabólitos do IBU por SPME

<u>CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO IBU</u>	
Extração	Dessorção
✓ Volume de urina: 500 µL	✓ Tempo de dessorção: 3 minutos
✓ Tempo de extração: 30 minutos	✓ Solvente de dessorção: metanol
✓ Fibra: CW-TPR 50 µm	✓ Volume de solvente de dessorção: 100 µL
✓ Tampão fosfato 1 mol L ⁻¹ pH 3,8: 1 mL	✓ Temperatura: 25° C
✓ Cloreto de sódio: 20% (m/v)	
✓ Temperatura: 25° C	

Quadro 4- Condições para extração da HCQ e seus principais metabólitos por SPME

<u>CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA EXTRAÇÃO DA HCQ E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS</u>	
Extração	Dessorção
✓ Volume de urina: 3000 µL	✓ Tempo de dessorção: 3 minutos
✓ Tempo de extração: 40 minutos	✓ Solvente de dessorção: metanol
✓ Fibra: PDMS-DVB 60 µm	✓ Volume de solvente de dessorção: 100 µL
✓ Tampão fosfato 1 mol L ⁻¹ pH 11: 1 mL	✓ Temperatura: 25° C
✓ Cloreto de sódio: 10% (m/v)	
✓ Temperatura: 25° C	

4.3- ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA HCQ E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS EM URINA EMPREGANDO LPME

4.3.1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE LPME

Inicialmente uma otimização prévia foi realizada adicionando 10% de cloreto de sódio (m/v), 250 μL de NaOH 2 mol L^{-1} , 1 mL de água em 3 mL de urina. Essa etapa foi implantada visando obter alguma extração dos analitos. Feito isso, uma otimização completa foi realizada variando os principais parâmetros que pudessem influenciar a LPME.

4.3.1.1- TIPO DE SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

O tipo de solvente orgânico empregado em LPME é de extrema importância na eficiência da extração. Os solventes empregados em LPME devem ser facilmente imobilizados nos poros da fibra e não devem ser voláteis. Além disso, esses solventes devem ser imiscíveis em água e a solubilidade dos analitos no solvente deve ser maior do que na fase doadora e menor do que na fase aceptora, no caso de sistemas de três fases (ZHAO; ZHU; LEE, 2002). Diversos tipos de solventes orgânicos foram testados: 1-octanol, acetato de butila, acetato de hexila, acetato de dodecila, éter dibutílico e éter n-hexílico. Todos esses solventes foram impregnados na fibra por 10 segundos e, em seguida, o excesso foi removido em ultrassom por 15 segundos. Quando acetato de butila e éter dibutílico foram testados nenhum dos compostos foi extraído. Este fato se deve, provavelmente, à relativa solubilidade desses solventes em água e perca durante o processo de extração (ZHU; ZHU; LEE, 2001). A Figura 39 mostra os resultados obtidos com os outros solventes. Como pode ser visto, os melhores resultados para quase todos os estereoisômeros foram obtidos utilizando 1-octanol como solvente de extração. A utilização desse solvente foi particularmente importante na extração do BDCQ que é um metabólito pouco excretado na urina. A maior eficiência do 1-octanol pode ser atribuída a relativa alta polaridade desse solvente e uma maior afinidade dos analitos quando comparada com os outros solventes. Portanto, 1-octanol foi utilizado para os estudos subsequentes.

Figura 39- Efeito do solvente de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Extração: 40 minutos; NaCl: 10% (m/v), NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. Conc.: HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹. n = 3.

4.3.1.2- TEMPO DE EXTRAÇÃO

Como SPME, LPME também é uma técnica de equilíbrio (PEDERSEN-BJERGAARD, RASMUSSEN, 1999) e todas as considerações que foram mencionadas em SPME podem ser extrapoladas para LPME. A eficiência da extração foi variada entre 10 e 60 minutos. Como pode ser visto na Figura 40, a recuperação aumenta até 40 minutos, atingindo o equilíbrio. A partir desse tempo, o aumento no tempo de extração não leva a aumento na recuperação. Um outro fator interessante notado, é que quanto maior o tempo de extração empregado maior é o erro observado. Esse fato pode ser devido à perda de solvente orgânico da membrana durante longos períodos de extração (ZHAO; ZHU; LEE, 2002). Em função desses resultados, 40 minutos foi selecionado como tempo de extração para os experimentos subsequentes. Embora esse tempo pareça longo, diversas extrações podem ser feitas ao mesmo tempo, já que o sistema de extração é simples e barato; diversos sistemas podem ser montados e utilizados ao mesmo tempo.

Figura 40- Efeito do tempo de extração na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Solvente de extração: 1-octanol, NaCl: 10% (m/v), NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. Conc.: HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹. n = 3.

4.3.1.3- ADIÇÃO DE SAL

A adição de sal em amostras aquosas vem sendo empregada para melhorar a eficiência da extração, principalmente em SPME (DE OLIVEIRA; CESARINO; BONATO, 2005a; DE OLIVEIRA; DE SANTANA; BONATO, 2005b). Como foi explicado anteriormente para SPME, esse fato se deve ao efeito “salting-out”. Assim, experimentos foram conduzidos variando a concentração de cloreto de sódio de 0 a 30% (m/v) (Figura 41). Como pode ser visto pelo gráfico, a recuperação aumenta de 0 a 10% de cloreto de sódio para todos estereoisômeros. Com maiores concentrações, a recuperação diminui, provavelmente devido à interações entre os analitos polares e o sal e também devido ao aumento na viscosidade do sistema, diminuindo a migração dos analitos para fase extratora, conforme explicado para SPME.

Figura 41- Efeito da adição de NaCl na recuperação dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos em urina por LPME. Solvente de extração: 1-octanol, tempo de extração 40 minutos, NaOH 2 mol L⁻¹ 250 µL, fibra de polipropileno de 7 cm. HCQ 416 ng mL⁻¹, metabólitos 333 ng mL⁻¹. n = 3.

4.3.1.4- COMPOSIÇÃO DA FASE ACEPTORA E FASE DOADORA

As composições das fases aceptoras e doadoras são de grande importância em LPME. Normalmente o pH da fase doadora é ajustado para manter os analitos na forma não-ionizada e o pH da fase aceptora é ajustado para manter os analitos na forma ionizada. Assim, para análise de fármacos com características básicas, o pH da solução doadora é ajustado para alcalino e da fase aceptora para ácido. O contrário é válido para fármacos com características ácidas. A otimização da fase aceptora foi realizada empregando 2 tipos de soluções ácidas, uma consistindo de um ácido forte (HCl) e outra de um ácido fraco (ácido acético), em três diferentes concentrações (Tabela 9). As soluções de HCl resultaram em uma fase aceptora com pH muito baixo (Tabela 9) e uma melhor recuperação foi observada com esse tipo de fase. Ácido clorídrico vem sendo usado com sucesso na extração de compostos básicos de matrizes biológicas (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; ANDERSEN et al., 2002; HALVORSEN et al., 2001; HALVORSEN et al., 2003). A baixa eficiência apresentada pela solução de ácido acético pode ser atribuída ao maior pH e tipo de fase aceptora (Tabela 9) (HALVORSEN et al., 2001). A fase doadora foi otimizada pela alcalinização da matriz, empregando hidróxido de sódio e solução tampão fosfato pH 11 em diferentes concentrações. Como pode ser visto na Tabela 10, os melhores

valores de recuperação e com menores erros foram observados com hidróxido de sódio. Esses resultados indicam que o aumento da concentração de NaOH não melhora a eficiência de extração significativamente. Além disso, quanto maior a concentração de NaOH menor a precisão observada. Com o emprego de solução tampão fosfato 250 mmol L⁻¹, a eficiência de extração foi similar a apresentada pelo NaOH, porém o desvio apresentado foi muito alto. Baseado nesses resultados, a fase aceptora escolhida para futuros experimentos foi HCl 100 mmol L⁻¹ e a fase doadora foi alcalinizada com solução de NaOH de tal forma a atingir a concentração de 125 mmol L⁻¹.

Tabela 9- Eficiência de extração da HCQ e seus metabólitos utilizando diferentes fases aceptoras

Fase aceptora	pH	Estereoisômeros Área do pico (média)								CV
		(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	
		HCQ	HCQ	DHCQ	DHCQ	DCQ	DCQ	BDCQ	BDCQ	
HCl 100 mmol L ⁻¹	1,00	62,2	70,2	58,7	62,6	63,4	57,8	77,5	81,1	<13,0
HCl 50 mmol L ⁻¹	1,35	7,3	9,9	8,6	11,3	9,0	8,3	9,6	10,3	<16,0
HCl 10 mmol L ⁻¹	2,07	3,5	3,5	3,7	3,9	3,6	2,1	3,3	3,6	<36,0
Ác. acético 100 mmol L ⁻¹	2,87	6,9	9,4	8,9	7,8	8,3	6,4	8,8	10,2	<34,0
Ác. acético 50 mmol L ⁻¹	3,00	5,1	6,1	6,5	6,4	6,4	5,9	7,9	8,1	<39,0
Ác. acético 10 mmol L ⁻¹	3,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-

Todas as extrações foram realizadas por 40 minutos, à 25°C, utilizando 1-octanol como solvente de extração. A concentração de NaOH e NaCl foram de 125 mmol L⁻¹ and 10% (m/v), respectivamente, nd: não detectado. HCQ: 416 ng mL⁻¹; DHCQ, DCQ e BDCQ: 333 ng mL⁻¹. n = 3.

Tabela 10- Eficiência de extração da HCQ e seus metabólitos utilizando diferentes fases doadoras

Fase doadora (Concentração final)	Estereoisômeros Área do pico (média)								CV
	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	
	HCQ	HCQ	DHCQ	DHCQ	DCQ	DCQ	BDCQ	BDCQ	
NaOH 125 mmol L ⁻¹	82,2	89,0	78,2	82,8	88,7	80,4	99,4	107,5	<6,0
NaOH 250 mmol L ⁻¹	80,0	87,0	88,0	90,2	86,5	82,6	108,9	115,5	<12,0
NaOH 625 mmol L ⁻¹	88,8	96,4	85,6	91,6	93,6	87,5	109,6	126,7	<18,1
T. fosfato pH 11 125 mmol L ⁻¹	70,5	76,8	67,9	73,8	82,6	74,4	93,6	102,1	<8,50
T. fosfato pH 11 250 mmol L ⁻¹	88,7	85,6	91,4	102,2	106,7	98,7	128,3	137,3	<17,3
T. fosfato pH 11 500 mmol L ⁻¹	68,4	74,9	67,5	75,4	86,9	72,1	81,6	93,0	<24,1

Todas as extrações foram realizadas por 40 minutos, à 25°C, utilizando 1-octanol como solvente de extração. A concentração de NaCl foi de 10% (m/v), A solução aceptora empregada foi HCl 100 mmol L⁻¹. HCQ: 416 ng mL⁻¹; DHCQ, DCQ e BDCQ: 333 ng mL⁻¹. n = 3.

4.3.2- CONDIÇÕES OTIMIZADAS DA LPME

O quadro 5 mostra as condições otimizadas na análise da HCQ e seus metabólitos por microextração em fase líquida.

Quadro 5- Condições estabelecidas para extração da HCQ e seus metabólitos por LPME

<u>CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA EXTRAÇÃO DA HCQ E SEUS METABÓLITOS POR LPME</u>	
✓ Volume de urina: 3000 µL	✓ Solvente de extração: 1-octanol
✓ Fibra: Polipropileno 7 cm	✓ Tempo de impregnação do solvente: 10 seg.
✓ NaOH 2 mol L ⁻¹ 250 µL	✓ Fase aceptora: HCl 100 mmol L ⁻¹
✓ Cloreto de sódio: 10% (m/v)	✓ Temperatura: 25° C
✓ Água: 1 mL	✓ Tempo de extração: 40 minutos

4.4- VALIDAÇÃO

Métodos analíticos para quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas têm um papel significativo na avaliação e interpretação da biodisponibilidade, bioequivalência e estudos farmacocinéticos (BRESSOLLE et al., 1996). O objetivo principal da validação de um método é estabelecer se o método analítico é adequado ao propósito a que se destina (FDA, 2001). Todas as variáveis do método devem ser consideradas, incluindo preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados e o uso da mesma matriz.

Agências internacionais como Food and Drug Administration (FDA) e Internacional Conference of Harmonization (ICH) são alguns dos órgãos que estabelecem parâmetros que devem ser seguidos para validação de métodos analíticos.

Na avaliação de métodos de quantificação de analitos em matrizes biológicas como urina, o FDA determina a avaliação dos seguintes parâmetros principais: linearidade, recuperação exatidão, precisão, seletividade/especificidade, limite de quantificação e estabilidade.

4.4.1- LINEARIDADE

As curvas analíticas estabelecem uma relação entre a resposta do instrumento e uma certa concentração do analito (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; FDA, 2001) e são usadas para avaliar a linearidade, que determina até que ponto esta relação se mantém linear. A linearidade deve ser demonstrada pela inclinação da reta (estatisticamente diferente de zero e reprodutível), o intercepto (não estatisticamente diferente de zero) e o coeficiente de correlação (não estatisticamente diferente de 1). É necessário usar um número suficiente de padrões para definir adequadamente a relação entre a concentração e resposta. A curva analítica deve ser construída usando pelo menos 5 ou 6 valores de concentração que devem abranger aquelas normalmente encontradas para o composto estudado (BRESSOLLE et al., 1996). A Anvisa, (2003), em sua nova regulamentação, define como valores aceitáveis de linearidade coeficientes de correlação acima de 0,98. Na avaliação da linearidade estabeleceu-se também que os desvios dos valores nominais não poderiam ser superiores a 15%, exceto para a concentração correspondente ao limite de quantificação, para a qual aceita-se desvios de até 20%. As Tabelas 11, 12 e 13 mostram, respectivamente, os valores obtidos na avaliação da linearidade dos métodos de análise do IBU e seus metabólitos, HCQ e seus principais metabólitos por SPME e HCQ e seus metabólitos por LPME. Como pode ser visto, todos os valores apresentados estão de acordo com as legislações vigentes.

Tabela 11- Recuperação e linearidade do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Recuperação		Linearidade		
	%	CV (%)	Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	r
(-)-(R)-IBU	19,8	11,8	0,25-25	$y = 758,08x + 96,69$	0,9997
(+)-(S)-IBU	19,1	11,5	0,25-25	$y = 630,34x + 56,33$	0,9997
(-)-(R)-IBUOH	1,6	7,5	5-50	$y = 52,541x - 58,96$	0,9960
(+)-(S)-IBUOH	1,5	5,8	5-50	$y = 59,256x - 34,22$	0,9951
(2'S,2S)-IBUCOOH	4,3	5,5	5-50	$y = 66,819x - 58,07$	0,9906
(2'R,2S)-IBUCOOH	4,6	6,1	5-50	$y = 69,017x - 113,17$	0,9885
(2'S,2R)-IBUCOOH	4,8	6,4	5-50	$y = 67,721x - 141,44$	0,9906
(2'R,2R)-IBUCOOH	4,6	4,9	5-50	$y = 50,239x - 110,06$	0,9912

CV: Coeficiente de variação, r: coeficiente de correlação

Tabela 12- Recuperação e linearidade do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Recuperação		Linearidade		
	%	CV (%)	Intervalo (ng mL^{-1})	Equação da reta	r
(-)-(R)-HCQ	9,5	3,5	50-1000	$y = 0,0024x + 0,0317$	0,9966
(+)-(S)-HCQ	9,2	3,2	50-1000	$y = 0,0023x + 0,0013$	0,9967
(-)-(R)-DHCQ	8,9	6,6	42-416	$y = 0,0008x + 0,0051$	0,9955
(+)-(S)-DHCQ	9,5	6,7	42-416	$y = 0,0008x + 0,0051$	0,9955
(-)-(R)-DCQ	13,7	6,8	42-416	$y = 0,0040x + 0,0375$	0,9940
(+)-(S)-DCQ	15,2	6,8	42-416	$y = 0,0044x + 0,0360$	0,9950

CV: Coeficiente de variação, r: coeficiente de correlação

Tabela 13- Recuperação e linearidade do método para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE

Estereoisômeros	Recuperação		Linearidade		
	%	CV (%)	Intervalo (ng mL^{-1})	Equação da reta	r
(-)-(R)-HCQ	87,5	7,6	10-1000	$y = 0,0015x - 0,0122$	0,9983
(+)-(S)-HCQ	85,1	9,8	10-1000	$y = 0,0016x - 0,0143$	0,9978
(-)-(R)-DHCQ	84,6	7,7	21-333	$y = 0,0026x - 0,0283$	0,9963
(+)-(S)-DHCQ	83,0	9,7	21-333	$y = 0,0026x - 0,0310$	0,9961
(-)-(R)-DCQ	90,2	13,1	21-333	$y = 0,0022x - 0,0175$	0,9942
(+)-(S)-DCQ	93,4	9,3	21-333	$y = 0,0023x - 0,0230$	0,9927
(-)-(R)-BDCQ	85,2	8,7	21-333	$y = 0,0027x - 0,0202$	0,9958
(+)-(S)-BDCQ	80,6	5,9	21-333	$y = 0,0027x - 0,0202$	0,9965

CV: Coeficiente de variação, r: coeficiente de correlação

4.4.2- RECUPERAÇÃO

A recuperação avalia a capacidade do processo de preparação da amostra em extrair o analito da matriz, assim como a variação dessa capacidade durante as análises através do cálculo do coeficiente de variação (CV).

A recuperação é calculada pela fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração calculada}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

Um conceito bem difundido há alguns anos atrás era que a recuperação estava diretamente relacionada com a precisão e exatidão. Alguns autores afirmavam que, em muitos casos, baixa recuperação resultava em baixa precisão (HUBERT et al., 1999). Porém, nem sempre esta relação é verdadeira e recuperações menores que 50% têm sido aceitas (KARNES et al., 1991; ANVISA 2003), desde que com precisão e exatidão aceitáveis. Além disso, a recuperação pode ser sacrificada intencionalmente para melhorar a seletividade (CAUSON et al., 1997). Em SPME, em muitos casos, a quantidade absoluta recuperada é relativamente pequena em relação a quantidade inicial presente (< 1%) (LORD, PAWLISZYN, 2000), porém desde que o método seja preciso e exato e não haja prejuízo na sua detectabilidade, essa recuperação pode ser aceita. Os valores de recuperação apresentados por LPME é superior aos apresentados pela SPME, podendo igualar aqueles obtidos por LLE, o que representa uma grande vantagem da técnica. Como pode ser visto na Tabela 13, os valores de recuperação da HCQ e seus metabólitos por LPME apresentou valores de recuperação entre 93,4% e 80%, com coeficiente de variação inferior a 13,1%. A extração por SPME apresentou valores de recuperação excelentes para os estereoisômeros do IBU, 19% com coeficientes de variação abaixo de 12% (Tabela 11) e para os estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos, entre 9,5% e 15,2% com coeficientes de variação inferior a 7% (Tabela 12). Para os metabólitos do IBU, foram obtidos valores de recuperação menores, entre 1,5% e 4,8%, com coeficientes de variação inferiores a 8% (Tabela 11).

4.4.3- PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão reflete a concordância entre resultados de análises simultâneas e também a concordância entre resultados de análises intercaladas, ambas obtidas de frações provenientes de uma mesma amostra homogênea. Esse parâmetro é normalmente expresso pelo coeficiente de variação (CV) de acordo com fórmula:

$$CV (\%) = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Onde S e $\bar{X}$ representam, respectivamente, a estimativa do desvio padrão e a média dos valores de concentração obtidos das amostras analisadas em replicata.

Exatidão, por sua vez, revela a concordância entre valores de concentração encontrados após os procedimentos analíticos (valor obtido) e aqueles teoricamente esperados (valor nominal). A exatidão é expressa em porcentagem do erro relativo, através da expressão:

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

A precisão nos estudos inter e intra-ensaios é determinada usando no mínimo três concentrações que devem estar na faixa de concentração esperada para as amostras. Esse parâmetro é avaliado pelo cálculo do CV. Com os métodos desenvolvidos foram obtidos valores de CV inferiores a 15% (Tabelas 14-19).

A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra e interensaios. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo que, para esse tipo de estudo, deve ser de até 15% do valor nominal (FDA, 2001). Para as três concentrações investigadas, no estudo intra-ensaio, a média dos erros relativos ficou abaixo de 5%, 15%, 10% e 13% para análise dos estereoisômeros do IBU, dos metabólitos do IBU, da HCQ e seus principais metabólitos por SPME e da HCQ e seus metabólitos por LPME, respectivamente (Tabelas 14-16). Nos estudos interensaios, a média

dos erros relativos ficou abaixo de 7%, 12%, 11% e 14% para análise dos estereoisômeros do IBU, dos metabólitos do IBU, da HCQ e seus principais metabólitos por SPME e da HCQ e seus metabólitos por LPME, respectivamente (Tabelas 17-19).

4.4.4- LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Limite de quantificação é definido como a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (CAUSON, 1997). O LQ pode ser considerado como a menor concentração empregada nas curvas analíticas desde que as seguintes condições sejam atendidas:

- A resposta do analito deve ser pelo menos 5 vezes a resposta de uma amostra branco;
- O pico do analito (resposta) deve ser identificável, e reprodutível, com precisão e exatidão inferiores a 20%.

Para análise do IBU, valores inferiores a 13% para o CV e inferiores a 5% para o erro relativo (Tabela 20) foram observados. Quanto à análise dos metabólitos do IBU, os valores obtidos foram inferiores a 15% para o CV e inferiores a 4% para o erro relativo (Tabela 20). Já para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME, os valores de CV foram inferiores a 17% e erros relativos inferiores a 12% (Tabela 21). Na análise da HCQ e seus metabólitos por LPME, os valores de CV foram inferiores a 16% e os erros relativos inferiores a 15% (Tabela 22).

Tabela 14- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 10) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Obtida, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-IBU	0,75 / 7,5 / 20	0,70 / 7,0 / 20,7	-6,6 / -6,6 / +3,5	10,6 / 6,6 / 8,2
(+)-(S)-IBU	0,75 / 7,5 / 20	0,70 / 7,2 / 21,2	-6,6 / -4,0 / +6,1	11,2 / 6,6 / 8,5
(-)-(R)-IBUOH	15 / 30 / 45	13,2 / 25,8 / 39,5	-12,0 / -14,0 / -12,3	11,7 / 5,0 / 5,3
(+)-(S)-IBUOH	15 / 30 / 45	13,5 / 26,4 / 40,1	-10,0 / -12,0 / -10,8	5,9 / 4,3 / 5,4
(2'S,2S)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	13,9 / 26,7 / 43,5	-7,3 / -11,0 / -3,3	6,8 / 10,0 / 7,0
(2'R,2S)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,0 / 26,7 / 44,1	-6,6 / -11,0 / -2,0	8,4 / 9,5 / 6,5
(2'S,2R)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,7 / 26,9 / 45,1	-2,0 / -10,3 / +0,2	8,3 / 9,7 / 8,0
(2'R,2R)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,4 / 26,9 / 44,9	-4,0 / -10,3 / -0,2	6,7 / 7,9 / 7,0

CV: coeficiente de variação

Tabela 15- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	120 / 600 / 960	119,6 / 548,9 / 865,2	-0,2 / -8,5 / -9,8	6,0 / 4,5 / 1,1
(+)-(S)-HCQ	120 / 600 / 960	121,1 / 551,3 / 865,0	+0,9 / -8,1 / -9,8	9,4 / 5,0 / 0,8
(-)-(R)-DHCQ	100 / 200 / 400	102,8 / 197,4 / 375,4	+2,8 / -1,2 / -6,1	8,6 / 11,7 / 5,3
(+)-(S)-DHCQ	100 / 200 / 400	102,6 / 196,6 / 362,1	+2,6 / -1,6 / -9,4	8,1 / 6,4 / 3,0
(-)-(R)-DCQ	100 / 200 / 400	107,5 / 195,8 / 382,1	+7,5 / -2,1 / -4,4	7,9 / 6,4 / 5,9
(+)-(S)-DCQ	100 / 200 / 400	109,9 / 192,8 / 393,1	+9,9 / -3,6 / -1,7	8,8 / 4,7 / 5,2

CV: coeficiente de variação

Tabela 16- Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 5) do método para análise da HCQ e seus metabólitos por CE.

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	30 / 300 / 600	31,7 / 299,4 / 620,8	+6,1 / -0,1 / +3,4	3,0 / 7,0 / 9,5
(+)-(S)-HCQ	30 / 300 / 600	32,7 / 300,2 / 601,2	+9,1 / 0,0 / +0,2	2,7 / 6,7 / 9,2
(-)-(R)-DHCQ	50 / 150 / 300	53,3 / 156,7 / 308,9	+6,7 / +4,4 / +3,0	3,9 / 7,4 / 8,9
(+)-(S)-DHCQ	50 / 150 / 300	53,3 / 130,5 / 297,0	+3,5 / -12,7 / -0,9	8,8 / 9,9 / 7,3
(-)-(R)-DCQ	50 / 150 / 300	45,1 / 148,3 / 300,5	-9,6 / -1,0 / +0,1	11,6 / 6,0 / 11,4
(+)-(S)-DCQ	50 / 150 / 300	48,3 / 155,4 / 325,0	-3,2 / +3,6 / +8,3	12,2 / 6,1 / 14,4
(-)-(R)-BDCQ	50 / 150 / 300	46,6 / 142,5 / 296,9	-6,7 / -4,9 / -1,0	10,3 / 7,4 / 11,3
(+)-(S)-BDCQ	50 / 150 / 300	45,1 / 142,9 / 307,3	-9,7 / -4,7 / +2,4	8,7 / 7,4 / 14,3

CV: coeficiente de variação

Tabela 17- Precisão e exatidão interensaios (n = 5) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Obtida, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-IBU	0,75 / 7,5 / 20	0,75 / 7,1 / 19,1	0,0 / -5,3 / -4,5	11,2 / 10,7 / 12,6
(+)-(S)-IBU	0,75 / 7,5 / 20	0,74 / 7,3 / 20,1	-1,3 / -2,6 / +0,5	12,1 / 10,2 / 12,7
(-)-(R)-IBUOH	15 / 30 / 45	15,4 / 28,7 / 43,7	+2,6 / -5,3 / -4,3	11,1 / 11,6 / 9,4
(+)-(S)-IBUOH	15 / 30 / 45	15,1 / 29,3 / 43,0	+0,6 / -2,3 / -4,4	11,5 / 11,2 / 8,3
(2'S,2S)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	13,9 / 26,7 / 43,5	-7,3 / -11,0 / -3,3	13,6 / 13,0 / 6,3
(2'R,2S)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,0 / 26,7 / 44,1	-6,6 / -11,0 / -2,0	11,3 / 10,2 / 8,2
(2'S,2R)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,7 / 26,9 / 45,1	-2,0 / -10,3 / +0,2	8,7 / 9,7 / 6,0
(2'R,2R)-IBUCOOH	15 / 30 / 45	14,4 / 26,9 / 44,9	-4,0 / -10,3 / -0,2	11,7 / 11,8 / 6,9

CV: coeficiente de variação

Tabela 18- Precisão e exatidão interensaios (n = 5 para cada concentração) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	120 / 600 / 960	127,7 / 541,6 / 904,2	+6,4 / -9,7 / -5,8	8,1 / 4,0 / 6,3
(+)-(S)-HCQ	120 / 600 / 960	127,0 / 546,6 / 900,9	+5,8 / -8,9 / -6,1	9,5 / 4,4 / 6,0
(-)-(R)-DHCQ	100 / 200 / 400	104,2 / 201,6 / 365,7	+4,2 / +0,8 / -8,5	5,8 / 6,9 / 4,2
(+)-(S)-DHCQ	100 / 200 / 400	102,3 / 192,7 / 360,3	+2,4 / -3,6 / -9,8	7,6 / 4,2 / 2,8
(-)-(R)-DCQ	100 / 200 / 400	109,1 / 184,9 / 358,1	+9,1 / -7,5 / -10,4	6,2 / 6,5 / 4,0
(+)-(S)-DCQ	100 / 200 / 400	108,1 / 182,4 / 358,5	+8,1 / -8,7 / -10,3	6,5 / 5,9 / 2,6

CV: coeficiente de variação

Tabela 19- Precisão e exatidão interensaios (n = 5 para cada concentração) do método para análise da HCQ e seus metabólitos por CE.

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	30 / 300 / 600	31,6 / 291,5 / 596,9	+5,5 / -2,8 / -0,5	7,9 / 8,4 / 11,3
(+)-(S)-HCQ	30 / 300 / 600	33,9 / 293,2 / 599,8	+13,1 / -2,2 / 0,0	4,2 / 9,0 / 11,7
(-)-(R)-DHCQ	50 / 150 / 300	51,1 / 154,0 / 287,2	+2,2 / +2,7 / -4,2	5,6 / 8,1 / 10,4
(+)-(S)-DHCQ	50 / 150 / 300	51,4 / 149,5 / 300,7	+2,9 / -0,3 / +0,2	7,5 / 12,1 / 10,8
(-)-(R)-DCQ	50 / 150 / 300	50,3 / 152,3 / 282,1	+0,7 / +1,6 / -5,9	10,2 / 10,6 / 6,8
(+)-(S)-DCQ	50 / 150 / 300	52,0 / 150,1 / 308,2	+4,0 / +0,1 / +2,7	7,6 / 10,3 / 10,4
(-)-(R)-BDCQ	50 / 150 / 300	50,0 / 151,4 / 273,9	0,0 / +0,9 / -8,6	8,3 / 8,3 / 11,8
(+)-(S)-BDCQ	50 / 150 / 300	48,9 / 146,2 / 282,6	-2,1 / -2,5 / -5,8	9,0 / 9,4 / 12,8

CV: coeficiente de variação

Tabela 20 -Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise do IBU e seus metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Obtida, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-IBU	0,25	0,26	+4,0	9,5
(+)-(S)-IBU	0,25	0,24	-4,0	12,3
(-)-(R)-IBUOH	5	5,0	0	8,4
(+)-(S)-IBUOH	5	5,0	0	8,8
(2'S,2S)-IBUCOOH	5	5,0	0	11,3
(2'R,2S)-IBUCOOH	5	5,0	0	14,2
(2'S,2R)-IBUCOOH	5	4,8	-4,0	12,2
(2'R,2R)-IBUCOOH	5	5,1	+2,0	9,5

CV: Coeficiente de variação

Tabela 21 - Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	50	54,9	9,9	13,9
(+)-(S)-HCQ	50	51,3	2,7	16,6
(-)-(R)-DHCQ	42	42,1	0,4	5,1
(+)-(S)-DHCQ	42	42,1	0,4	5,1
(-)-(R)-DCQ	42	46,7	11,2	7,4
(+)-(S)-DCQ	42	46,6	11,1	6,2

CV: Coeficiente de variação

Tabela 22 - Limite de quantificação (n = 5) do método desenvolvido para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME-CE

Estereoisômeros	Concentração Nominal, (ng mL^{-1})	Concentração Obtida, (ng mL^{-1})	Exatidão Erro relativo (%)	Precisão CV (%)
(-)-(R)-HCQ	10	9,2	-7,3	4,1
(+)-(S)-HCQ	10	10,1	1,3	12,8
(-)-(R)-DHCQ	21	18,4	-12,3	6,8
(+)-(S)-DHCQ	21	17,8	-14,9	9,6
(-)-(R)-DCQ	21	19,9	-5,1	14,2
(+)-(S)-DCQ	21	19,7	-6,0	15,4
(-)-(R)-BDCQ	21	17,8	-14,8	12,3
(+)-(S)-BDCQ	21	20,0	-4,7	6,8

CV: Coeficiente de variação

4.4.5-SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

Especificidade é a habilidade de dosar inequivocamente o analito na presença de compostos endógenos. Seletividade inclui a habilidade de separar o analito de produtos de degradação, metabólitos e fármacos co-administrados (BRESSOLLE et al., 1996). Entretanto, os termos seletividade e especificidade são freqüentemente intercambiáveis.

Fatores determinantes da seletividade são: o processo de preparação da amostra, as condições de separação (coluna e fase móvel) e o sistema de detecção. Devido ao menor custo e maior flexibilidade operacional, a seleção e otimização do processo de preparação da amostra é, normalmente, o procedimento mais conveniente e eficaz na eliminação de interferentes.

A presença de interferentes endógenos deve ser avaliada pela análise de amostras branco da matriz. Portanto, amostras de urina obtidas de voluntários foram avaliadas e não apresentaram interferentes em nenhum dos métodos desenvolvidos, como pode ser coprovado para o IBU (Figura 45A), para os metabólitos do ibuprofeno (Figura 44A) e para a HCQ e seus principais metabólitos analisados por SPME (Figura 46A) ou LPME (Figura 51A). A interferência de outros fármacos co-administrados foi avaliada analisando-se soluções-padrão desses fármacos. Analisando os t_R ou t_m obtidos e o formato dos picos, verificou-se que nenhum dos fármacos analisados poderiam interferir na análise do IBU e de seus metabólitos (Tabela 23). Quanto a análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME (Tabela 24), o atenolol, a cloroquina e a tioridazina poderiam interferir na análise já que possuem tempos de retenção próximos ao dos fármacos ou padrão interno. Quanto ao método desenvolvido para análise da HCQ e seus metabólitos por LPME, somente a tioridazina poderia ser um interferente, pois possui o mesmo tempo de migração que o padrão interno, metropolol. Apesar do salbutamol e a mefloquina também terem o mesmo tempo de migração que o metroplol, esses fármacos não são extraídos nas condições desenvolvidas para esse método, portanto não podem interferir nas análises (Tabela 25).

Tabela 23- Avaliação da capacidade de interferência de alguns fármacos nos métodos de análise do IBU e de seus metabólitos

Fármaco	t_{RI}	t_{RM}	Fármaco	t_{RI}	t_{RM}	Fármaco	t_{RI}	t_{RM}
IBU	12,0/13,9	3,8	Dipirona	ND	ND	Imipramina	6,9	ND
2-IBUOH	7,3	13,0/15,3	Etossuximida	ND	ND	Fenilbutazona	ND	11,9
IBUCOOH	6,4/7,1/8,9	17,6/19,3/ 21,2/24,4	Fenproporex	ND	35,7	Fenacetina	8,7	36,7
Ác. salicílico	8,7	5,8	Fluoxetina	5,8	NA	Fenilefrina	5,4	ND
Ác. valpróico	ND	ND	Haloperidol	7,2	ND	Salbutamol	5,3	ND
Atenolol	6,0	ND	Carbamazepina	9,0	ND	Tioridazina	8,3	54,3
Amitriptilina	7,0	ND	Clordiazepóxido	10,1	ND	Trimetropin	5,9	ND
			Cimetidina	5,6	ND	Diazepam	22,9	38,2

t_{RI} = tempo de retenção em minutos no método do IBU; t_{RM} = tempo de retenção em minutos no método dos metabólitos ND = não detectado pelo sistema nas condições de análise até 30 minutos de análise. NA = não analisado.

Tabela 24- Avaliação da interferência de algumas drogas na análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Fármaco	t_r	Fármaco	t_r	Fármaco	t_r
Mirtazapina	3,6/4,3	Cafeína	ND	Fenilbutazona	ND
HCQ	9,4/10,6	Carbamazepina	ND	Fenacetina	ND
DHCQ	15,4/17,5	Clordiazepóxido	13,7	Fenilefrina	ND
DCQ	6,3/7,1	Cloroquina	3,9/4,3	Salbutamol	ND
BDCQ	12,0	Fluoxetina	ND	Ácido salicílico	4,9
Mefloquina	ND	Dipirona	ND	Tioridazina	9,2/17,1
Metrotexato	ND	Etossuximida	ND	Trimetropim	ND
Atenolol	10,8	Fenproporex	ND	Ácido valpróico	ND
Amitriptilina	ND	Haloperidol	ND	Terbutalina	ND

t_r, tempo de retenção em minutos. ND: não detectado pelo método até 30 min de análise.

Tabela 25-Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise da HCQ e seus metabólitos por CE-LPME.

Fármaco	t_m 220 nm	t_m 343 nm	Fármaco	t_m 220 nm	t_m 343 nm	Fármaco	t_m 220 nm	t_m 343 nm
Metropolol	4,4	ND	Dipirona	6,5	ND	Amitriptilina	4,6	ND
HCQ	5,3/5,7	5,3/5,7	Etosuximida	4,7	ND	Fenilefrina	7,6	ND
DHCQ	6,6/6,2	6,6/6,2	Femproporex	4,0/4,1	ND	Salbutamol	4,3/4,4	ND
DCQ	7,0/7,5	7,0/7,5	Haloperidol	4,6	ND	Ac. salicílico	6,0	ND
BDCQ	7,4/8,0	7,4/8,0	Fenilbutazona	5,7	ND	Tioridazina	4,4	4,4
Ibuprofeno	5,0	ND	Fenacetina	4,2	ND	Trimetropim	4,2	ND
Mefloquina	4,4/4,6	ND	Carbamazepina	4,0	ND	Ac. valpróico	ND	ND
Metrotexato	5,8	5,8	Clordiazepóxido	4,2	4,2	Terbutalina	8,5/11,0	ND
Atenolol	4,5	ND	Cimetidina	4,0	ND			

t_m, tempo de migração em minutos; ND, não detectado pelo método até 30 min de análise.

4.4.6- ESTABILIDADE

O método analítico empregado deve ser indicador de estabilidade, demonstrando especificidade e detectabilidade para os produtos de degradação eventualmente formados. A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (FDA, 2001).

Foi determinada a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela 26) e estabilidade no tempo e condições de análise (Tabela 27). Para ambos os testes, a estabilidade foi determinada utilizando a menor e maior concentrações das amostras da precisão usadas na validação do método.

Na análise do IBU, com exceção da estabilidade no tempo e condições de análise, para a concentração baixa, em todos os ensaios obteve-se $p > 0,11235$. Para a amostra referente à concentração baixa, a estabilidade foi obtida com adição de 1 mL de tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 3,8. Amostras de urina, quando mantidas a temperatura ambiente por algumas horas tem seu pH alterado (FURA et al., 2003), tornando-se mais alcalinas com o passar do tempo. Isso ocorre, provavelmente, porque a urina perde CO₂ para o ambiente.

Os estudos conduzidos por FURA et al., (2003) mostraram que após 24 horas em temperatura ambiente, o pH de uma amostra de urina passou de 7,07 para 8,68. Outro estudo conduzido por Caviglioli et al., (2002) mostrou que o IBU gerou 13 produtos de degradação após tratamento de decomposição térmica e oxidativa, enfatizando a sensibilidade a processos de oxidação que o IBU pode sofrer. Apesar de nosso estudo não avaliar as mudanças do pH durante os testes de estabilidade e nem haver dados na literatura mostrando que o IBU é instável em meio básico, as poucas degradações que puderam ocorrer nas amostras mencionadas acima foram capazes de alterar a recuperação do IBU sendo, portanto, estatisticamente significativa. Dessa forma é importante estabelecer que caso a amostra não seja processada imediatamente após descongelamento, deve-se pelo menos adicionar a solução tampão para controlar o pH. Quanto aos métodos para análise dos metabólitos do IBU, para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME e da HCQ e seus metabólitos por LPME, os estudos de estabilidade não mostraram diferenças estatisticamente significantes (Tabelas 26 e 27).

Tabela 26- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Concentração	Valor do p							
	(-)-(R)- IBU	(+)-(S)- IBU	(-)-(R)- IBUOH	(+)-(S)- IBUOH	2'S,2S COOH	2'R,2S COOH	2'S,2R COOH	2'R,2R COOH
baixa	0,45032	0,51923	0,31508	0,36434	0,42658	0,24538	0,71997	0,26191
alta	0,11235	0,11361	0,33613	0,24529	0,40404	0,29098	0,47782	0,18351
	(-)-(R)- DCQ	(+)-(S)- DCQ	(-)-(R)- HCQ	(+)-(S)- HCQ	(-)-(R)- DHCQ	(+)-(S)- DHCQ	(-)-(R)- BDCQ	(+)-(S)- BDCQ
baixa	0,40803	0,60600	0,39296	0,28264	0,41883	0,54727	0,71868	0,44715
alta	0,21971	0,22341	0,32953	0,31836	0,47331	0,59143	0,62001	0,67719

Tabela 27- Estabilidade no tempo e condições de análise

Concentração	Valor do p							
	(-)-(R)- IBU	(+)-(S)- IBU	(-)-(R)- IBUOH	(+)-(S)- IBUOH	2'S,2S COOH	2'R,2S COOH	2'S,2R COOH	2'R,2R COOH
baixa	0,0018	0,0029	0,2666	0,22698	0,30416	0,2661	0,62169	0,18481
alta	0,47787	0,48283	0,13829	0,24529	0,06258	0,05127	0,08804	0,10839
baixa ^a	0,84768	0,87082						
	(-)-(R)- DCQ	(+)-(S)- DCQ	(-)-(R)- HCQ	(+)-(S)- HCQ	(-)-(R)- DHCQ	(+)-(S)- DHCQ	(-)-(R)- BDCQ	(+)-(S)- BDCQ
baixa	0,41227	0,44473	0,55415	0,46988	0,25683	0,39974	0,28657	0,39914
alta	0,53023	0,53097	0,35006	0,81423	0,66280	0,51863	0,76369	0,80122

^a amostras com adição de 1 mL de tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 3,8.

4.4.7- RACEMIZAÇÃO

A inversão configuracional de compostos quirais pode ocorrer como demonstrado por De Gaitani, Martinez, Bonato, (2004) para a tioridazina-2-sulfóxido após a exposição dos estereoisômeros a luz UV. A diferença de estabilidade entre os estereoisômeros faz com que haja uma tendência energética favorável da conversão de um dos estereoisômeros em seu par complementar mais estável. Dessa forma, fontes energéticas e interações com outros compostos (proteínas, excipientes dos comprimidos, materiais adsorventes de extração, etc) podem fornecer a energia necessária para a inversão de configuração. Assim, a avaliação da possível inversão configuracional é de grande importância no desenvolvimento de métodos de quantificação de fármacos quirais. O teste de racemização foi realizado para os fármacos que foram extraídos por SPME, já que o material de extração é um polímero adsorvente.

A análise dos cromatogramas representados nas Figuras 42, 43 e 44 demonstra que a extração por SPME não causou a racemização de nenhum dos estereoisômeros do IBU (Figura 41), de seus metabólitos (Figura 42) ou da HCQ e seus principais metabólitos (Figura 43) em amostras de urina.

Figura 42- Teste de racemização dos estereoisômeros do IBU durante a SPME. Cromatograma (A) representa urina fortificada com (-)-(R)-IBU (1) e (B) urina fortificada com (+)-(S)-IBU (2). Coluna Chiralpak AD-RH[®]; Fase móvel: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75:25, v/v); vazão: 0,45 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

Figura 43- Teste de racemização dos estereoisômeros dos metabólitos do IBU durante a SPME. Cromatograma A representa urina fortificada com (+)-(S)-IBUOH (1), B com (-)-(R)-IBUOH (2), C com (2'S,2S)-IBUCOOH (3), D com (2'R,2S)-IBUCOOH (4), E com (2'S,2R)-IBUCOOH (5) e F com (2'R,2R)-IBUCOOH (6). Coluna Chiralpak AS[®]; Fase móvel: hexano : isopropanol (95 : 5 v/v) + 0,05% de TFA; vazão: 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

Figura 44- Teste de racemização dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos durante a SPME. Cromatograma A representa urina fortificada com (-)-(R)-DCQ (1), B com (+)-(S)-DCQ (2), C com (-)-(R)-HCQ, (3), D (+)-(S)-HCQ (4), E (-)-(R)-DHCQ (5) e F com (+)-(S)-DHCQ (6). Coluna Chiralcel OD-H®; Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2 v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min⁻¹; detecção em 343 nm.

4.5- APLICAÇÃO DO MÉTODO

As análises das amostras de urina dos voluntários medicados com ibuprofeno e hidroxiclороquina foram realizadas empregando as condições de SPME e LPME otimizadas, validadas e separação cromatográfica pré-estabelecidas.

A Figura 45A mostra a análise do branco de urina do voluntário pelo método desenvolvido para análise do IBU. Como pode ser visto no cromatograma, o método não apresentou interferentes, confirmando a sua seletividade. No cromatograma B da Figura 45, aparecem os estereoisômeros do IBU em amostra de urina coletada 2-4 horas após administração do medicamento. A curva concentração urinária dos estereoisômeros do IBU *versus* tempo de coleta está representada na Figura 46; o perfil obtido é semelhante a

resultados da literatura (WRITH et al., 1989; TAN et al., 1997a), demonstrando a inversão metabólica quiral que ocorre no metabolismo do IBU.

Figura 45- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 200 mg de IBU. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 2-4 horas. (-)-(R)-IBU (1) e (+)-(S)-IBU (2). Fase móvel: metanol : solução de ácido fosfórico pH 3 (75 : 25, v/v); vazão: 0,45 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

Figura 46- Gráfico da concentração urinária *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina de um voluntário, após dose oral única de 200 mg de IBU

Quanto aos metabólitos do IBU, o mesmo pode ser afirmado quanto à seletividade do método (Figura 47A). No cromatograma B da Figura 47, aparecem os estereoisômeros do IBUCOOH e 2-IBUOH em uma amostra de urina coletada 4-6 horas após administração do ibuprofeno. A quantidade excretada acumulada está demonstrada na Figura 48. Do total da

dose administrada, 20,1% e 40,2% (expresso como porcentagem da dose administrada) foram excretados como 2-hidroxi e carboxi metabólitos, respectivamente. Esses resultados corroboram com dados prévios da literatura (RUDY, ANLIKER; HALL, 1990; TAN et al.,1997c, 2002).

Figura 47- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 200 mg de IBU. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 4-6 horas. (+)-(S)-2-IBUOH (1), (-)-(R)-2-IBUOH (2), (2'S,2S)-IBUCOOH (3), (2'R,2S)-IBUCOOH (4), (2'S,2R)-IBUCOOH (5), (2'R,2R)-IBUCOOH (6). Coluna Chiralpak AS[®]. Fase móvel: hexano : isopropanol (95 : 5, v/v) + 0,05% TFA; vazão: 1,2 mL min⁻¹; detecção em 230 nm.

Figura 48- Gráfico da quantidade excretada acumulada *versus* intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina de um voluntário, após dose oral única de 200 mg de IBU.

O cromatograma referente a análise de uma amostra branco de urina para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME esta mostrado na Figura 49A. Mais uma vez, como pode ser notado pelo branco, o método não apresenta interferentes no tempo de

retenção dos fármacos. A Figura 49B mostra o cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina coletada de um indivíduo 12 horas após administração do medicamento. A quantidade excretada acumulada está representada na Figura 50. A Figura 51 mostra os eletroferogramas obtidos na análise da HCQ e seus metabólitos por CE-LPME. A quantidade excretada acumulada está representada na Figura 52. No método desenvolvido por LPME, do total da dose administrada, 2,7%, 0,06% e 0,06% foram excretados como HCQ, DHCQ e DCQ, respectivamente. A quantidade de BDCQ excretada foi muito baixa, não sendo possível sua quantificação pelo método. Já no método desenvolvido por SPME, do total da dose administrada, 2,6%, 0,08% e 0,08% foram excretados como HCQ, DHCQ e DCQ, respectivamente. Verifica-se, portanto, que os valores obtidos pelos dois métodos foram bastante similares. Além disso, a excreção parece ser estereosseletiva, no tempo estudado, com o enantiômero (+)-(S)- sendo excretado em uma maior quantidade do que o enantiômero (-)-(R)- em ambos estudos. Os dados apresentados estão de acordo com os existentes na literatura (IREDALE; FIEGER; WAINER, 1993; FIEGER; IREDALE; WAINER, 1993; IREDALE; WAINER, 1992).

Figura 49- Cromatogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 400 mg de HCQ. Cromatograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) e cromatograma (B), tempo de coleta entre 12-16 horas. 1-*rac*-mirtazapina, 2-(-)-(R)-DCQ, 3-(+)-(S)-DCQ, 4-(-)-(R)-HCQ, 5-(+)-(S)-HCQ e 7-(+)-(S)-DHCQ. Coluna Chiralcel OD-H®. Fase móvel: hexano : etanol : metanol (96 : 2 : 2, v/v/v) + 0,2% de DEA; vazão: 1,3 mL min⁻¹; detecção em 343 nm.

Figura 50- Gráfico da quantidade excretada acumulada versus intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina por SPME-HPLC de um voluntário, após dose oral única de 400 mg de HCQ.

Figura 51- Eletoferogramas de amostras de urina do voluntário que recebeu dose oral única de 400 mg de HCQ. Eletoferograma (A) corresponde ao tempo de coleta zero (branco de urina) em 2 comprimentos de onda e eletroferograma (B), tempo de coleta entre 12-16 horas. 1-(-)-(R)-HCQ, 2-(+)-(S)-HCQ 3-(-)-(R)-DHCQ, 4-(+)-(S)-DHCQ, 5-(-)-(R)-DCQ, 6-(+)-(S)-DCQ and 7-(+)-(S)-BDCQ, detecção em 343 nm. Condições de análise descrito na Figura 23.

Figura 52- Gráfico da quantidade excretada acumulada versus intervalo de coleta referente à análise de amostras de urina por LPME-CE de um voluntário, após dose oral única de 400 mg de HCQ.

4.6- COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DA LITERATURA

As Tabelas 28 e 29 relacionam as principais características, equipamentos, condições de análise e resultados apresentados pelos métodos para análise do IBU e de seus principais metabólitos em urina e da HCQ e seus metabólitos, em urina ou plasma, respectivamente, descritos na literatura. Como pode ser visto, os métodos desenvolvidos apresentam vantagens sobre todos os demais em relação ao processo de preparação das amostras, onde o consumo de solventes orgânicos é zero (método do IBU) ou muito pouco (método para análise dos metabólitos do IBU e da HCQ e seus metabólitos).

No método desenvolvido, a análise direta dos estereoisômeros do IBU é realizada sem a necessidade de derivação quiral o que não acontece com maioria dos métodos descritos, com exceção do método desenvolvido por De Vries, et al., 1994. Apesar do método desenvolvido por Tan et al., 1997c para análise dos metabólitos apresentar a separação direta em coluna quiral, o método é realizado em duas etapas (aquiral-quiral), o que o deixa mais trabalhoso e demorado. Somente o método desenvolvido por Rudy; Anliker; Hall, (1990) foi capaz de resolver todos os estereoisômeros dos metabólitos simultaneamente, porém o tempo de análise era muito longo, aproximadamente 1 hora. O método

desenvolvido nesse estudo apresenta tempo total de análise de 25 minutos e análise simultânea de todos estereoisômeros, o que representa mais uma vantagem. Em geral, os dados da validação estão próximos aos aqui apresentados, sendo que somente o trabalho desenvolvido por Tan et al., 1997c para análise dos metabólitos estão bem superiores ao nosso em relação à precisão e exatidão. Porém, todos os resultados apresentados no presente trabalho atingem os critérios recomendados na literatura (FDA, 2001, ANVISA, 2003).

Quanto à análise da HCQ e seus metabólitos, a grande vantagem refere-se a utilização da LPME e SPME, já que os procedimentos de separação dos estereoisômeros foram adaptados de métodos anteriormente descritos na literatura por nosso grupo (CARDOSO, BONATO, 2005; CARDOSO, JABOR, BONATO 2006). De qualquer forma, esses métodos permitem a resolução dos enantiômeros em uma só etapa, o que não acontece com os outros métodos, onde a separação ocorre em uma sequência aquiral-quiral de análise (MCLACHLAN; TETT; CUTLER, 1991; FIEGER; IREDALE; WAINER, 1993). Outra vantagem, em relação aos demais métodos descritos na literatura é o tempo de análise apresentado. Tanto para LPME-CE como para SPME-HPLC o tempo total de análise foi inferior a 20 minutos (já incluindo o tempo do condicionamento entre as análises por CE). No método descrito por McLachlan, Tett, Cutler, (1991), o último estereoisômero elui em 52 minutos [(S)-BDCQ] e no método descrito por Fieger, Iredale, Wainer, (1993), o último estereoisômero elui em torno de 30 minutos [(+)-(S)-DCQ].

Tabela 28- Comparação entre os métodos descritos para análise estereosseletiva do IBU e de seus metabólitos em urina

Autores	Coluna Fase móvel	Extração	Dados da Validação				
			LQ	P _{inter}	E _{inter}	P _{intra}	E _{intra}
NicollGriffith et al., (1988) ¹	Tipo Pirkle (R)-N-3,5-dinitrobenzoilfenilglicina Hexano:clorofórmio:2-propanol	-	-	-	-	-	-
Wright et al., (1992) ¹	C ₁₈ (Phenomenex) Acetonitrila:água:ácido acético : trietilamina	ELL com isoctano : 2-propanol (95:5, v/v)	0,25	1-13	0,1-15	-	-
De Vries et al., (1994) ¹	Chiral AGP Tampão fosfato:2-propanol	ELL com éter : hexano (20:80, v/v)	0,25	-	-	3-6	-
Tan et al., (1997a) ¹	C ₁₈ (Waters Resolve) Tampão fosfato:acetonitrila	ELL com hexano : isopropanol (90:10, v/v)	0,1	3,5 - 6,6	-9,0 – 0,8	2,9 – 4,5	-8,0 – 0,2
De Oliveira et al., (2005 a) ¹	Chiralpak AD-RH Metanol:solução de ácido fosfórico 1 mol L ⁻¹ pH 3	SPME (0% de solvente)	0,25	10,2 – 12,7	-4,4 – 1,1	6,6 – 12,3	-6,6 – 6,1
Rudy et al., (1990) ²	C ₈ (Ultrasphere) Água:metanol:n-butanol	ELL com diclorometano (100 %)	6 ^a 6 ^b	5,2 – 7,1 ^a 3,5 – 3,7 ^b	-	5,9 – 7,2 ^a 3,9 – 4,6 ^b	5,5 – 7,1 ^a 3,8 – 4,6 ^b
Tan et al., (1997c) ²	Chiralpak AD Hexano:etanol	ELL com diclorometano: acetato de etila (14 : 1, v/v)	2,5 ^a 5 ^b	1,3 – 6,9 ^a 2,7 – 5,0 ^b	-0,1 – 0,2 ^a -0,2 – 0,2 ^b	2,0 – 9,7 ^a 0,7 – 3,2 ^b	-0,6 – 0,4 ^a -0,4 – 0,4 ^b
De Oliveira et al., (2005 b) ²	Chiralpak AS Hexano:2-propanol	SPME com metanol (100 µL)	5 ^a 5 ^b	6,0 – 13,6 ^a 8,3 – 11,6 ^b	-7,6 – 6,7 ^a -5,3 – 2,2 ^b	6,8 – 14,2 ^a 4,3 – 11,7 ^b	-10,9 – 0,7 ^a -13,8 – 1,9 ^b

¹ métodos para análise dos estereoisômeros do IBU. ² métodos para análise dos estereoisômeros do IBUCOOH e 2-IBUOH. ^a dados para análise do IBUCOOH; ^b dados para análise do 2-IBUOH. LQ: limite de quantificação (µg mL⁻¹); P_{inter}: precisão interensaio; E_{inter}: exatidão interensaios; P_{intra}: precisão intra-ensaio; E_{intra}: exatidão intra-ensaio. ELL: extração líquido-líquido.

Tabela 29- Comparação entre os métodos descritos para análise estereosseletiva da HCQ e de seus metabólitos em urina, sangue total e plasma

Autores	Coluna / Fase móvel Capilar/Tampão	Extração/ matriz	Dados da Validação				
			LQ	P _{inter}	E _{inter}	P _{intra}	E _{intra}
McLachlan et al., (1991)	Chiral AGP / solução de fosfato de sódio 16 mmol L ⁻¹ : 2-propanol 5,5% (v/v) : DMOA 0,02% - pH ajustado para 7 com NaOH 1 mol L ⁻¹	ELL com éter dietílico 100% / Sangue total, urina	10	-	-	-	-
Iredale et al., (1993) ¹	Chiral AGP / tampão fosfato de sódio 0,03 mol L ⁻¹ pH 7 : etanol : acetonitrila	ELL com éter dietílico 100% / Plasma, urina	-	-	-	-	-
Fieger et al., (1993)	Chiral AGP / tampão fosfato de sódio 0,03 mol L ⁻¹ pH 7 : etanol : acetonitrila	ELL com éter dietílico 100% / Urina	10	2,2-5,1	-1,1 - +3,8	1,5-4,3	-4,1 - + 6,6
De Oliveira et al., (2006 a) ¹	Chiralcel OD-H / hexano : etanol : metanol	SPME com metanol (100 µL) / Urina	50 ^a 42 ^b	2,6 – 9,5	-10,4 - +9,1	0,8 – 11,7	-9,8 – + 9,9
De Oliveira et al., (2006 b) ²	Capilar de sílica não-recoberto / tampão tris-hidroxiaminometano com 30 mg mL ⁻¹ de 2-β-CD-OH e 1% de β-CD-SO ₄ /	LPME com 1-octanol (≈20 µL) / Urina	10 ^a 21 ^b	12,8 – 4,2	-8,6 - +13,1	2,7 – 14,4	-12,7 - + 9,1

¹ métodos para análise dos estereoisômeros da HCQ e seus principais metabólitos por SPME. ² métodos para análise dos estereoisômeros da HCQ e seus metabólitos por LPME. ^a dados para análise da HCQ; ^b dados para análise dos metabólitos. LQ: limite de quantificação (ng mL⁻¹); P_{inter}: precisão interensaio; E_{inter}: exatidão interensaios; P_{intra}: precisão intra-ensaio; E_{intra}: exatidão intra-ensaio. ELL: extração líquido-líquido.

5-CONCLUSÕES

Como mencionado anteriormente, o objetivo do presente trabalho foi avaliar duas técnicas de microextração, a microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME). Assim, foram desenvolvidos quatro novos métodos estereosseletivo de análise do ibuprofeno, seus 2 principais metabólitos, HCQ e seus principais metabólitos, em urina. Após desenvolvimento dos métodos, algumas conclusões podem ser mencionadas quanto às duas microtécnicas de extração.

Assim, quanto à SPME pode-se concluir que:

- ✓ É uma técnica de fácil manuseio, reproduzível, livre de solventes orgânicos e bem estabelecida na análise de analitos com diversas características. Inúmeras aplicações da técnica estão descritas na literatura e ela já está bem difundida no meio científico;
- ✓ Como qualquer outra técnica, apresenta algumas desvantagens; a principal desvantagem na análise de fármacos em fluidos biológicos é o baixo valor de recuperação, o que implica diretamente na detectabilidade do método. Atingir baixos limites de quantificação é uma característica fundamental na análise de fármacos em fluidos biológicos. Assim, para fármacos utilizados em baixa dosagem, o uso da SPME pode ser um problema. Nesse caso, é recomendável o uso de detectores com alta sensibilidade, como a espectrometria de massas;
- ✓ Outras desvantagens relacionadas a SPME são o baixo número de fibras disponíveis no mercado e a fragilidade mecânica e química apresentada por elas. Isso resulta em uma seletividade limitada, restrição de uso em uma ampla faixa de pH e de solventes orgânicos apolares. O uso de solventes orgânicos apolares é fundamental em análises enantiosseletivas, já que a maioria das separações são realizadas no modo normal. Assim, fibras resistentes ao hexano ou outros solventes apolares seriam de muita utilidade. Com isso, a dessorção poderia ser realizada na própria fase móvel, sem a necessidade de usar um solvente mais polar e evaporá-lo em seguida;

- ✓ É também uma técnica manual quando utilizada com HPLC. Apesar de existirem interfaces disponíveis no mercado, o procedimento de extração ainda é manual;
- ✓ Por fim, é uma técnica de custo relativamente alto, necessitando de fibras e suporte para fibras para extração, relativamente caros, por serem importados. O risco de “carryover” é possível já que as fibras não são descartáveis;

Já em relação a LPME, pode-se concluir que:

- ✓ A técnica apresenta um excelente valor de recuperação quando comparada a SPME, não prejudicando a detectabilidade do método;
- ✓ O número de solventes disponíveis no mercado é grande não restringindo a seletividade do método. As fibras empregadas são resistentes a diversas condições extremas de extração, como: valores extremos de pH, solventes; além disso, possui resistência mecânica excelente;
- ✓ É uma técnica de menor custo quando comparada a SPME. Os equipamentos utilizados são equipamentos comuns de um laboratório de cromatografia, como seringas e suporte com hastes comuns. A fibra também é barata, sendo que uma extração fica ao redor de R\$1,00 (calculado somente o valor da fibra). Isso possibilita que as fibras sejam trocadas a cada extração não havendo o risco de “carryover” como ocorre em SPME;
- ✓ Apresenta também algumas desvantagens. A principal dela é a total manipulação dos equipamentos necessários à extração. Assim todo procedimento de extração é manual como cortar as fibras, imersão nos solventes, ajuste nas seringas. Isso leva a grandes erros no método, tornando necessário o uso da padronização interna. Comparada à SPME, a LPME apresenta uma reprodutibilidade menor, se não for empregado o padrão interno;
- ✓ Outra desvantagem é que existe um pequeno consumo de solvente orgânico (ao redor de 20 µL por extração). A literatura referente a LPME é pequena quando comparada a SPME sendo difícil a busca de respostas. O que deve ser levado em consideração

nesse caso, é que a técnica é mais recente do que a SPME (criada em 1999). Futuramente esse problema provavelmente será resolvido.

Assim, após ter trabalhado com as duas técnicas pode-se dizer que elas se complementam. A SPME é mais reprodutível, mais fácil de trabalhar e o consumo de solventes orgânicos é menor (quando a dessorção é realizada na própria fase móvel). Já a LPME possui seletividade e valores de recuperação maiores. Para ambas as técnicas, a automatização não se encontra disponível no mercado, o que leva a maiores erros e análises mais longas quando comparadas às técnicas que já são totalmente automatizadas como a extração em fase sólida, por exemplo. Isso é um grande problema, o que vem limitando pesquisadores, laboratórios e indústrias a utilizarem estas técnicas. Esta atitude é perfeitamente compreensível já que na rotina de um laboratório, centenas de análises são realizadas em um único dia e métodos automatizados são realmente necessários. Contudo acreditamos que futuramente essas técnicas serão automatizadas (o que teoricamente é possível) e que os grandes laboratórios passarão a utilizá-las, pois a economia de solvente orgânico é considerável e os maiores beneficiários dessa economia serão a sociedade e o meio ambiente. É importante mencionar que recentemente Ouyang, Zhao e Pawliszyn (2007) desenvolveram um protótipo para automatização da LPME acoplada a cromatografia gasosa.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONS, L.; GRENNAN, D. M.; SIDDIQUI, M. The binding of ibuprofen to plasma proteins. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 25, p. 815-818, 1983.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.52, p.679-691, 2000.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; WAINER, I. W. *The impact of stereochemistry on drug development and use*. Wiley, New York, 1997.

ADAMS, S. S.; CLIFFFE, E. E.; LESSEL, B.; NICHOLSON, J. S. Some biological properties of 2-(4-isobutylphenyl) propionic acid. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 56, p. 1686, 1967.

ADAMS, S.S.; BRESLOFF P.; MASON C.G.; Pharmaceutical differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J. Pharm. Pharmacol.* London, v. 28, p. 256-257, 1976.

ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: A promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 889, p. 3-14, 2000.

ALTRIA, K. D. Fundamentals of capillary electrophoresis theory. In: ALTRIA, K. D. *Capillary electrophoresis guide book*. New Jersey, Humana Press, 1996. cap. 1, p. 3-15.

ANDREWS, P. Praziquantel: mechanism of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 129-156, 1985.

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. 303-312, 2002.

ANIGBOGU, V. C; COPPER, C. L; SEPANIAK, M. J Separation of stereoisomers of aminoglutethimide using three capillary electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 705, p. 343-349, 1995.

ARAI, T. Chiral separation of pharmaceuticals possessing a carboxy moiety. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.717, p. 295-311, 1998.

ARMSTRONG, D. W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y; BAGWILL, J. R.; Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v. 66, p. 1473-1484, 1994.

ARMSTRONG, D.W.; NAIR, U.B. Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 18, p. 2331-2342, 1997.

ARMSTRONG, D. W.; LIU, Y.; EKBORG-OTT, K. H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations. *Chirality*, New York, v. 7, p. 474-497, 1995.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.*, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em 10 de novembro de 2004.

AVGERINOS, A., HUTT, A. J. Interindividual variability in the enantiomeric disposition of ibuprofen following the oral administration of racemic drug to healthy volunteers. *Chirality*, New York, v. 2, p. 249-256, 1990.

BAILLIE, T. A.; ADAMS, W. J.; KAISER, D. G.; OLANOFF, L. S.; HALSTEAD, G. W.; HARPOOTLIAN, H.; VAN GIESSEN, G. Mechanistic studies of the metabolic chiral inversion of (R)-ibuprofen in humans. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, Baltimore, v. 249, n. 2, p. 517-523, 1989.

BARTOLINCIC, A.; DRUSKOVIC, V.; SPOREC, A.; VINKOVIC, V. Development and validation of HPLC methods for the enantioselective analysis of bambuterol e albuterol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 36, p. 1003-1010, 2005.

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.

BAUZA, R.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Supercritical fluid extraction with in situ chiral derivatization for the enantiospecific determination of ibuprofen in urine samples. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 450, p. 1-11, 2001.

BELL, C. L. Hydroxychloroquine sulfate in rheumatoid-arthritis – long-term response rate and predictive parameters. *Am. J. Med.*, New York, v. 75 p. 46-51, 1983.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 22, p. 428-439, 2003.

BLUMENSTEIN, J. J. In: COLLINS, A. N.; CROSBY, J. *Chirality and Industry II. Developments in the manufacture of optically active compounds*. Wiley, New York, cap. 2, p. 11, 1997.

BONATO, P. S.; DEL LAMA, M. P. F. M, DE CARVALHO, R. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v. 796, p. 413-420, 2003.

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

BROCKS, D. R.; SKEITH, K. J.; JOHNSTON, C. et al. Hematologic disposition of hydroxychloroquine enantiomers. *J. Clin. Pharmacol.* New York, v.34, p.1088-1097, 1994.

BROCKS, D. R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. *Clin. Pharmacokinet.* New York, v.42, p.1359-1382, 2003.

BUNKE, A.; JIRA, T. Use of cationic cyclodextrin for enantioseparation by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 798, p. 275-280, 1998.

BUSSON, M. Update on ibuprofen: review article. *J. Int. Med. Res.*, Sussex, v. 14, p. 53-62, 1986.

CALDWELL, J. J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug-metabolism. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 694, p. 39-48, 1995a.

CALDWELL, J. J. Chiral pharmacology and the regulation of new drugs. *Chem. Ind.*, London, v. 5, p. 176-179, 1995b.

CARDOSO, C. D.; JABOR, V. A. P.; BONATO, P. S. Capillary electrophoretic chiral separation of hydroxychloroquine and its metabolites in the microsomal fraction of liver homogenates. *Electrophoresis*. Weinheim, v. 27, p. 1248-1254, 2006.

CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an in vitro metabolic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 37, p. 703-708, 2005.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* New York, v. 23, p. 1029-1038, 2000.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*; Amsterdam, v. 689; p. 175-180; 1997.

CAVIGLIOLI, G.; VALERIA, P.; BRUNELLA, P.; SERGIO, C.; ATTILIA, A.; GAETANO, B. Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 30, p. 499-509, 2002.

CEDERBERG, C; ANDERSSON, T; SKÅNBERG, I. Omeprazole: pharmacokinetics and metabolism in man. *Sc. J. Gastroenterol.*, Oslo, v. 166, p. 33-40, 1989.

CHANG, W. Y.; SUNG, Y. H.; HUANG, S. D. Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 495, p. 109-122, 2003.

CHANKVETDAZE, B; ENDRESZ, G; BLASCHKE, G. About some aspects of the use of charged cyclodextrins for capillary electrophoresis enantioseparation. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 15, p. 804-807, 1994.

DAVIES, E. F.; AVERY, G. S. Ibuprofen: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in rheumatic disorders. *Drugs*, Basel, v. 2, p. 416-446, 1971.

DAVIES, N. M. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen: The first 30 years. *Clin. Pharmacokinet.*, New York, v. 34, p. 101-154, 1998.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; CESARINO, E. J.; BONATO, P. S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v.818, p. 285-291, 2005 a.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; SANTANA, F. S. M.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 538, p. 25-35, 2005 b.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of hydroxychloroquine and its metabolites in human urine by liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 28, n. 7, p. 1081-1091, 2007.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in human urine by solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, Weinheim, no prelo, 2007.

DE VRIES, J. X.; SCHMITZKUMMER, E.; SIEMON, D. The analysis of ibuprofen enantiomers in human plasma and urine by high-performance liquid-chromatography on an alfa-1-acid glycoprotein chiral stationary-phase. *J. Liq. Chromatogr.*, Heidelberg, v. 17, p. 2127-2145, 1994.

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.

DUCHARME, J.; FIEGER, H.; DUCHARME, M. P. KHALIL, S. K. W.; WAINER, I. W. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after single oral dose of the racemate to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 40, p.127-133, 1995.

DUCRET, A.; TRANI, M.; PEPIN, P.;LORTIE, R. Chiral high performance liquid chromatography resolution of ibuprofen esters. *J. Pharm. Biom. Anal.*, Oxford, v. 16, p. 1225-1231, 1998.

EASTON, C. J.; LINCOLN, S. F. Chiral discrimination by modified cyclodextrins. *Chem. Soc. Rev. Cambs*, v. 25, p. 163-170, 1996.

EGGINGER, G.; LINDNER, W.; BRUNNER, G.; STOSCHITZKY, K. Direct enantioselective determination of (R)- and (S)-propranolol in human plasma. Application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; Oxford, v. 12, p. 1537-1545, 1994.

EL-MOUELHI, M.; RUELIUS, H. W.; FENSELAU, C.; DULIK, D. M. Species- dependent enantioselective glucuronidation of three 2-arylpropionic acids. Naproxen, ibuprofen and bexaprofen. *Drug Metab. Disp.*, Baltimore, v. 15, p. 767-772, 1987.

EMAMI, J.; PASUTTO, F. M.; MERCER, J. R.; et al. Inhibition of insulin metabolism by hydroxychloroquine and its enantiomers in cytosolic fraction of liver homogenates from healthy and diabetics rats. *Life Sci*. Oxford, v. 64, p. 325-335, 1999.

ESDAILE, J. M. The efficacy of antimalarials in systemic lupus-erythematosus. *Lupus*, Hampshire, v. 2, p. S3-S8, 1993.

EVANS, A. M. Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 42, p. 237-256, 1992.

EVANS, A. M. Comparative pharmacology of S-(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clin. Rheumat.*, New York, v. 20, p. 9-14, 2001.

FIEGER, H.; IREDALE, J.; WAINER, I. W. Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio. *Chirality*, New York, v. 5, p. 65-70, 1993.

FILLET, M.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Enantioseparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using mixtures of anionic and uncharged β -cyclodextrins as chiral additives. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 18, p. 1013-1018, 1997.

FOX, R. I Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin. Arthr. Rheum.*, Philadelphia, v. 23, p. 82-91, 1993.

FURA, A.; HARPER, T. W.; ZHANG, H.; FUNG, L.; SHYU, W. C. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford v. 32, p. 513-522, 2003.

GAITANI, C. M.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S. Degradation and configurational changes of thioridazine-2-sulfoxide. *J. Pharm. Biom. Anal.*, Oxford, v. 36, p. 601-607, 2004.

GASPER, M. P.; BERTHOD, A.; NAIR, U. B.; ARMSTRONG, D. W. Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations. *Anal. Chem.*, Washington, v. 68, p. 2501-2514, 1996.

GEISLINGER, G.; DIETZEL, K.; LOEW, D.; SCHUSTER, O.; RAU, G.; LACHMANN, G.; BRUNE, K. High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, its metabolites and enantiomers in biological fluids. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v. 491, p. 139-149, 1989.

GILAR, M.; BOUVIER, E. S. P.; COMPTON, B. J. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 909, p. 111-135, 2001.

GLOWKA, F. K.; KARAZNIEWICZ, M.; High performance capillary electrophoresis method for determination of ibuprofen enantiomers in human serum and urine. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 540, p. 95-102, 2005.

GORECKI, T.; PAWLISZYN, J.; Sample introduction approaches for solid-phase microextraction rapid GC. *Anal. Chem.*, Washington, v. 67, p. 3265-3274, 1995.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 792, p. 179 -225, 1997.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 965, p. 129-161, 2002.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatography techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 27, p. 357-372, 2002.

HAGINAKA, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 253-273, 2001.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; REUBSAET, J. L. E.; RASMUSSEN K. E. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. *J. Sep. Sci.*, Weinheim, v. 26, p. 1520-1526, 2003.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 760, p. 219-226, 2001.

HARRIS, D. C. Métodos cromatográficos e eletroforese capilar. In: HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. 6^a Ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005. cap. 26, p. 643-650.

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.

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 validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 391, p. 135-148, 1999.

HUANG, S. D.; HUANG, H. I.; SUNG, Y. H. Analysis of triazine in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, Amsterdam, v. 64, p. 887-893, 2004.

IREDALE, J.; FIEGER, H.; WAINER, I. W. Determination of the stereoisomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma and urine following a single oral administration of racemic hydroxychloroquine. *Semin. Arthritis Rheum*. Philadelphia, v. 23, p. 74-81, 1993.

IREDALE, J.; WAINER, I.W. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, Amsterdam, v. 573, p. 253-258, 1992.

JABOR, V. A. P.; LANCHOTE, V. L., BONATO, P. S. Enantioselective analysis of ibuprofen in human plasma by anionic cyclodextrin-modified electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 27, p. 3041-3047, 2002.

JEANNOT M. A., CANTWHEEL, Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.*, Washington, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

KANG, G. W.; KO, J. H.; CHEONG, W. J. Thermodynamic study of enantioseparation of arylpropionic acids with a chiralcel OJ-H stationary phase. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* New York, v. 28, p. 513-526, 2005.

KARNES H. T.; SHIU G.; SHAH V. P.; Validation of bioanalytical methods. *Pharm. Res.*, Hingham, v. 8, p. 421-426, 1991.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

KEPP, D. R.; SILLELMANN, U. G.; HANSEN, S. H. Simultaneous quantitative determination of the major phase I and II metabolites of ibuprofen in biological fluids by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 696, p. 235-241, 1997.

KERN, J. & KIRKLAND, K. Chiral separations. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*, 2 ed., New York, 1997. Cap. 12, p. 537-615.

KNIHINIICKI, R. D.; DAY, R. O.; WILLIAMS K. M. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs – I: In vitro studies of ibuprofen and flurbiprofen. *Biochem. Pharmacol.*, London, v. 38, p. 4389-4395, 1989.

KNIHINIICKI, R. D.; DAY, R. O.; WILLIAMS K. M. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs – II: racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen CoA synthetase. *Biochem. Pharmacol.*, London, v.42, p. 1905-1911, 1991.

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.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. Chiral separations by capillary electrophoresis. *Chromatographia*. Basel, v. 34, p. 505-512, 1992.

KUMAZAWA, T.; LEE, X. P.; SATO, K.; SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 492, p. 49-67, 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.

LEE, E. J. D.; WILLIAMS, K. M. Chirality – Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic. *Clin. Pharmacokinet.*, New York, v. 18, p. 339-345, 1990.

LEE, E. J. D.; WILLIAMS, K. DAY, R.; GRAHAM, G.; CHAMPION, D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 19, p. 669-674, 1985.

LEE, M. R.; YEH, Y. C.; HSIANG, W. S.; CHEN, C. C. Application of solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry for determination of chlorophenols in urine. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 707, p. 91-97, 1997.

LEEMANN, T. D.; TANSON, C.; BONNABRY, C.; DAYER P. A major role for cytochrome P450 TB (CYP2C) subfamily in the actions of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs Exp. Clin. Res.*, Carouge, v. 9, p. 189-195, 1993.

LEMKO, C. H.; CAILLE, G.; FOSTER, R. T. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of ibuprofen: Improved sensitivity and sample processing efficiency. *J. Chromatogr. Biom. Applic.* Amsterdam, v. 619, p. 330-335, 1996.

LIN, H.H.; SUNG, Y. H.; HUANG, S. D. Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of phenylurea herbicides in aqueous samples. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1012, p. 57-66, 2003.

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

LORD, H.; PAWLISZYN, Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 3899-3906, 1997.

LOUCH, D.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic-compound extraction from water using liquid-coated fused-silica. *Anal. Chem.*, Washington, v. 64; p. 1187-1199, 1992.

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

MAYER S.; SCHURIG V. Enantiomer separation using mobile and immobile cyclodextrin derivatives with electromigration. *Electrophoresis*, London, v. 15, p. 835-841, 1994

MCLACHLAN, A. J.; TETT, S. E.; CUTLER, D. J. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in biological fluids using an α_1 -acid glycoprotein stationary phase. *J. Chromatogr. Biom. Applic.* Amsterdam, v. 570, p. 119-127, 1991.

MCLACHLAN, A. J.; TETT, S. E.; CUTLER, D. J. DAY, R. O. Disposition and absorption of hydroxychloroquine enantiomers following a single dose of the racemate. *Chirality*, New York, v. 6, p. 360-364, 1994.

MCLACHLAN, A. J.; CUTLER, D. J; TETT, S. E.;. Plasma protein binding of the enantiomers of hydroxychloroquine and metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 44, p. 481-484, 1993.

MIDHA, K. K.; HUBBARD, J. W.; RAWSON, M. J.; MCKAY, G.; SCHWEDE, R. The roles of stereochemistry and partial areas in parallel design study to asses the bioequivalence of two formulations of hydroxychloroquine: a drug with a very long half life. *Eur. J. Pharm. Sci.* Amsterdam, v. 28, p. 283-292, 1996.

MILLS, R. F. N.; ADAMS, S. S.; CLIFFE, E. E.; DICKINSON, W.; NICHOLSON, J. S. The metabolism of ibuprofen. *Xenobiotica*, Oxon, v. 3, p. 589-598, 1973.

MONTEIL-RIVERA, F.; BEAULIEU, C.; DESCHAMPS, S.; PAQUET, L.; HAWARI, J. Determination of explosives in environmental water samples by solid-phase microextraction-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1048, p. 213-221, 2004.

MONTERO, M. T.; ESTELRICH, J. VALLS, O. Binding of non-steroidal anti-inflammatory drugs to human serum albumin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 62, p. 21-25, 1990.

NICHOLSON, J. S. Ibuprofen In: *Chronicles of Drug Discovery*, ed. By J. S. Bindra and D. Lednicer, v. 1 p. 149-172, 1982.

NICOLLGRIFFITH, D. A.; INABA, T.; TANG, B. K.; KALOW, W. Method to determine the enantiomers of ibuprofen from human-urine by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr. Biom. Apl.*, Amsterdam, v. 428, p. 103-112, 1988.

NOWAK, R. Single-isomer levalbuterol: A review of the acute data. *Curr All. Asthma. Rep.* Philadelphia, v. 3, p. 172-178, 2003.

OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; HATADA, K. Chromatographic chiral resolution .14. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phases for high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* Amsterdam, v. 389, p. 95-102, 1987.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 666, p. 403-419, 1994.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharides derivates for chromatographic separation of enantiomers. *Angew. Chem. Int. Edit.*, Berlin, v. 37, p. 1020-1043, 1998.

OUYANG, G.; ZHAO, W.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1138, p. 47-54, 2007.

PALIWAL, J. K.; SMITH, D. E.; COX, S. R. BERARDI, R.R.; DUNNKUCHARSKI, V.A.; ELTA, G.H. Stereoselective, competitive and nonlinear plasma protein binding of ibuprofen enantiomers as determined in vivo in healthy subjects. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, New York, v.21, p. 145-161, 1993.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, Washington, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 21, p. 579-585, 2000.

PETTERSSON, K. J.; OLSSON, A. Liquid chromatographic determination of the enantiomers of ibuprofen in plasma using a chiral AGP column. *J. Chromatogr. Biom. Applic.*, Amsterdam, v. 563, p. 414-418, 1991.

PSILLAKIS, E., KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, Washington, v.22, n. 10, p. 565-574, 2003.

QUANG, C. Y.; KHALEDI, M. G. Extending the scope of chiral separation of basic compounds by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 692, p. 253-265, 1995.

QUATRARO, A.; CONSOLI, G.; MAGNO, M.; et al. Hydroxychloroquine in decompensated, treatment-refractory noinsulin-dependent diabetes mellitus: a new job for an old drug? *Ann Intern. Med.*, Philadelphia, v. 112, p. 678-681, 1990.

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.

RASMUSSEN, K. E., PEDERSEN- BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v.23, n. 1, p. 1-11, 2004.

RAWJEE, Y. Y; STAERK, D. U; VIGH, G. Capillary electrophoretic chiral separations with cyclodextrin additives. I. acids: Chiral selectivity as a function of pH and the concentration of β -cyclodextrin for fenoprofen and ibuprofen. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 635, p. 291-306, 1993.

REUBSAET, K. J.; NORLI, H. R.; HEMMERSABACH, P.; RASMUSSEN, K. E. Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase microextraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental desing strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 18, p. 667-680, 1998.

RUDY, A. C.; ANLIKER, K. S.; HALL, S. D. High-performance liquid chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. *J. Chromatogr. Biom. Appl.*, Amsterdam, v. 528, p. 395-405, 1990.

RUDY, A. C.; KNIGHT, P. M.; BRATER, D. C.; HALL, S. D. Stereoselective metabolism of ibuprofen in human: administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, Baltimore, v. 256, p. 1133-1139, 1991.

SARRIÓN, M. N.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 947, p. 155-165, 2002.

SHINDO, H.; CALDWELL, J. Regulatory aspects of the development of chiral drugs in Japan – A status-report. *Chirality*, New York, v. 3, p. 91-93, 1991.

SMITH, D. E.; PALIWAL, J. K.; COX, S. R.; BERARDI, R. R.; DUNNKUCHARSKI, V. A.; ELTA, G. H. The effect of competitive and non-linear plasma protein binding on the stereoselective disposition and metabolic inversion of ibuprofen in healthy subjects. *Biopharm. Drug Disp.*, Sussex, v. 15, p. 545-561, 1994.

SMITH, R. M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Pratical HPLC method development*. 2 ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 537-610, 1997.

STALCUP, A. M.; GAHM, K. H. Application of sulfated cyclodextrins to chiral separations by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, Washington, v. 68, p.1360-1368 , 1996.

SUPELCO, *Solid phase microextraction fiber assemblies*, 1999.

TACHIBANA, K.; OHNISH, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p.127-154, 2001.

TAN, S. C.; BAKER, J. A.; STEVENS, N.; BIASI, V.; SALTER, C.; CHALAUX, M.; AFARINKIA, K.; HUTT, A. J. Synthesis, chromatography resolution and chiroptical properties of carboxyibuprofen stereoisomers: major metabolites of ibuprofen in man. *Chirality*, New York, v. 9, p. 75-87, 1997b

TAN, S. C.; JACKSON, S. H. D.; SWIFT, C. G.; HUTT, A. J. Enantioespecific analysis of ibuprofen by high performance liquid chromatography. Determination of free and total drug enantiomer concentration in serum and urine. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 46, n. 1/2, p. 23-32, 1997a.

TAN, S. C.; JACKSON, S. H. D.; SWIFT, C. G.; HUTT, A. J. Stereospecific analysis of the major metabolic of ibuprofen in urine by sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 701, p. 53-63, 1997c.

TAN, S. C.; PATEL, B. K.; JACKSON, S. H. D.; SWIFT, C. G.; HUTT, A. J. Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica*, Oxon, v. 32, n. 8, p. 683- 697, 2002.

TETT, S. E.; MCLACHLAN, A. J.; CUTLER, D. J.; DAY, R. O. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxychloroquine enantiomers in patients with rheumatoid arthritis receiving multiple doses of racemate. *Chirality*, New York, v. 6, p. 355-359, 1994

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G. J.; Solid-phase microextraction for analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 745, p. 49-82, 2000.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados no tratamento das protozoonoses: Malária. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª Ed., Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. cap. 40, p.709-724.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 167-194, 2000.

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.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for industry. Bioanalytical method validation*, 2001. Disponível em: www.fda.gov/cder/guidance/index.htm. Acesso em: 1 junho de 2004.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 532-530, 2000.

WAINER, I. W. in: Wainer I. W.; *Drug Stereochemistry, analytical methods and pharmacology*. 2 ed., Marcel Dekker, New York, 1993, Chapter 6.

WANG, J. A.; WARNER, I. M. Chiral separations using micellar electrokinetic chromatography and a polymerized chiral micelle. *Anal. Chem.*, Washington, v. 66, p. 3773-3776, 1994.

WARD, T. J.; FARRIS III, A. B.; Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 73-89, 2001.

WECHTER, W. J.; LOUGHEAD, D. G.; REISCHER, R. J.; VANGIESSEN, G. J.; KAISER, D. G. Enzymatic inversion at saturated carbon: nature and mechanism of the inversion of R (-)-p-iso-butyl hydratropic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Diego, v. 61, p. 833-837, 1974.

WEI, Y.; NYGARD, G. A.; KHALIL, S. K. W. A HPLC method for the separation and quantification of the enantiomers of hydroxychloroquine and its three major metabolites. *J. Liq. Chromatogr.* New York, v. 17, p. 3479-3490, 1994.

WHITE, P. F.; HAM, J.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J.; Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology*, Iowa, v. 52, p. 231-239, 1980.

WRIGHT, M. R.; SATTARI, S.; BROCKS, D. R.; JAMALI, F. Improved high-performance liquid-chromatography assay-method for the enantiomers of ibuprofen. *J. Chromatogr. Biom. Apl.*, Amsterdam, v. 583, p. 259-265, 1992.

WORLE, B; WOLLENBERG, A; SCHALLER, M; KUNZELMANN, KH; PLEWIG, G; MEURER, M. Chronic ulcerative stomatitis. *Br. J. Dermatol.* Oxon, v. 137, p. 262-265, 1997.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Tokyo, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

ZHAO, L.; ZHU, L.; LEE, H. K. Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 963, p. 239-248, 2002.

ZHU, L.; ZHU, L.; LEE, H. K. Liquid-liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 924, p. 407-414, 2001.