IGOR RAFAEL DOS SANTOS MAGALHÃES

**Aplicação da microextração em fase líquida na análise de alguns
fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia - área de concentração Toxicologia, para obtenção do título de Doutor em Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Magalhães, Igor Rafael dos Santos.

Aplicação da microextração em fase líquida na análise de alguns fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma, 2009.

148 f.: il.; 30 cm

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

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

1. antimaláricos. 2. cromatografia líquida. 3. microextração em fase líquida. 4. plasma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Igor Rafael dos Santos Magalhães

Aplicação da microextração em fase líquida na análise de alguns fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma

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

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIAS

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

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

AGRADECIMENTOS

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

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC), aos que já passaram e aos que ainda estão no grupo. Obrigado pela companhia, momentos descontraídos e auxílio durante esta jornada.

Aos funcionários do Departamento de Física e Química: José Tomaz, Maria Perpétua Del Lama, Rosana Frangiosi e Valquíria Jabor pela colaboração, apoio técnico e disposição em ajudar.

Aos colegas e funcionários Maria Paula Marques e Natalino Bocardo do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo, pela atenção e suporte proporcionados.

Às funcionárias do Laboratório de Farmacologia, Mirian Contin e Juliana Vercesi, pela colaboração na aplicação dos métodos desenvolvidos.

Ao funcionário do Biotério desta Faculdade, Reinaldo Batista, pelo auxílio prestado no manejo dos animais.

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

Às funcionárias Joseane Ferreira, Solange Bocardo e Zita Gregório pela amizade e apoio durante a pós-graduação.

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

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

"Que eu jamais esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor"

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

MAGALHÃES, I. R. S. **Aplicação da microextração em fase líquida na análise de alguns fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma**. 2009. 148 f. Tese (Doutorado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Atualmente, a malária é considerada a principal infecção parasitária existente e apresenta distribuição mundial. Dentre as alternativas terapêuticas utilizadas, destacam-se cloroquina (CQ), mefloquina (MQ) e, recentemente, arteméter (ART). Segundo a literatura, estudos farmacocinéticos destes fármacos têm sido dificultados pela ausência de métodos adequados de análise em fluidos biológicos e, no caso dos fármacos quirais (CQ e MQ), com capacidade de determinar os enantiômeros individualmente. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego da microextração em fase líquida (LPME) na preparação de amostras para a determinação destes três fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma. O método para análise enantiosseletiva de CQ e metabólitos teve a LPME como técnica de preparação de amostras, a qual apresentou valores de recuperação no intervalo de 28-66%. Estes analitos foram separados na coluna Chirobiotic V em fase polar-orgânica, com posterior detecção por espectrometria de massas (MS), com interface de eletronebulização (ESI) no modo positivo. O método desenvolvido foi linear no intervalo de 5-500 ng mL⁻¹ para todos os analitos avaliados. A disposição cinética de CQ e do principal metabólito monodesetilcloroquina (DCQ) em ratos sugere enantiosseletividade após administração do fármaco na forma racêmica, com maiores concentrações de (+)-(S)-CQ e (-)-(R)-DCQ. O método para análise dos enantiômeros de MQ e

do metabólito aquiral carboximefloquina (CMQ) também foi desenvolvido empregando LPME na preparação das amostras. A extração destes analitos foi realizada em duas etapas para eficaz recuperação dos mesmos (valores entre 35-38%). Os analitos foram separados na coluna Chirobiotic T em fase polar-orgânica, com detecção por absorção no ultravioleta em 285 nm. O método apresentou linearidade no intervalo de 50-1500 e 50-3000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros de MQ e CMQ, respectivamente. A disposição cinética de MQ em ratos indica enantiosseletividade com maiores concentrações de (+)-(RS)-MQ após administração do fármaco na forma racêmica. A separação cromatográfica em fase reversa de ART e metabólito diidroartemisinina (DHA) foi alcançada utilizando-se coluna contendo Si-Zr-PMTDS como fase estacionária e a detecção destes analitos foi realizada empregando-se MS no modo ESI positivo. O procedimento otimizado de LPME em duas fases para extração de ART e DHA em plasma resultou em valores de recuperação de 32 e 25%, respectivamente. O método desenvolvido foi linear no intervalo de 5-1000 ng mL⁻¹ para ambos os analitos. O estudo piloto de disposição cinética em ratos evidenciou maiores concentrações de DHA. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade da LPME para extração destes antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma.

Palavras-chave: antimaláricos, cromatografia líquida, microextração em fase líquida, plasma.

ABSTRACT

MAGALHÃES, I. R. S. **Application of liquid-phase microextraction to the analysis of some antimalarial drugs and their metabolites in plasma.** 2009. 148 p. Thesis (Doctoral Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Currently, malaria is the main parasitic infection and shows worldwide distribution. Among therapeutic options used, chloroquine (CQ), mefloquine (MQ) and, more recently, artemether (ART) have been standing out. According to the literature, pharmacokinetic studies of these drugs have been hampered by the lack of proper methods of analysis in biological fluids and, regarding the chiral drugs (CQ and MQ), with the ability to determine the individual enantiomers. Therefore, the aim of this work was to evaluate the utilization of liquid-phase microextraction as the sample preparation technique for the determination of these antimalarial drugs and their metabolites in plasma. The enantioselective analysis of CQ and its metabolites was carried out using LPME as technique of sample preparation, which yielded recovery rates within 28-66%. These analytes were resolved on a Chirobiotic V column in the polar-organic mode and further detected using mass spectrometry (MS) with electrospray interface (ESI) in the positive mode. The developed method was linear in the range of 5-500 ng mL⁻¹ for all analytes studied. The kinetic disposition of CQ and its main metabolite monodesethylchloroquine (DCQ) in rats suggests enantioselectivity following the administration of the racemic drug, with higher concentrations of (+)-(S)-CQ and (-)-(R)-DCQ. The method for the analysis of the enantiomers of MQ and its achiral metabolite carboxymefloquine (CMQ) also had LPME as technique of sample preparation. The extraction of

these analytes was carried out in two-steps to obtain efficient recovery rates (values within 35-38%). The analytes were resolved on a Chirobiotic T column in polar-organic mode and ultraviolet detection was performed at 285 nm. The method was linear in the range of 50-1500 and 50-3000 ng mL⁻¹ for the enantiomers of MQ and CMQ, respectively. The kinetic disposition of MQ in rats indicates enantioselectivity with higher concentrations of (+)-(*RS*)-MQ following the administration of the racemic drug. The chromatographic resolution of ART and its metabolite dihydroartemisinin (DHA) in the reversed mode was achieved utilizing a column containing Si-Zr-PMTDS as stationary phase and their detection was conducted employing MS in the positive ESI mode. The optimized two-phase LPME procedure for the extraction of ART and DHA from plasma showed recovery values of 32 and 25%, respectively. The developed method was linear over the range of 5-1000 ng mL⁻¹ for both analytes. The pilot study of kinetic disposition in rats showed higher concentrations of DHA. The obtained results confirm the feasibility of LPME for the extraction of these antimalarial drugs and their metabolites from plasma.

Keywords: antimalarials, liquid chromatography, liquid-phase microextraction, plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Instrumentação básica utilizada em eletroforese capilar.....	28
Figura 2. Principais modos empregados na microextração em fase sólida: extração direta e extração via <i>headspace</i>	31
Figura 3. Fotografias da configuração tradicional empregada na microextração em fase líquida.....	32
Figura 4. Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida: duas fases e três fases.	33
Figura 5. Estruturas da cloroquina e dos metabólitos monodesetilcloroquina e bisdesetilcloroquina.....	36
Figura 6. Estrutura da hidroxicloroquina, utilizada como padrão interno.....	39
Figura 7. Fotografias da configuração desenvolvida para microextração em fase líquida.....	46
Figura 8. Separação dos enantiômeros da CQ, DCQ e BDCQ empregando as colunas Chirobiotic T e Chirobiotic V no modo polar-orgânico de eluição.....	51
Figura 9. Melhor separação dos enantiômeros da CQ, DCQ e BDCQ empregando a coluna Chirobiotic V.	52
Figura 10. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição com diferentes porcentagens de solvente orgânico..	54
Figura 11. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição com diferentes valores de pH da solução-tampão.....	55
Figura 12. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição.	55
Figura 13. Seleção do solvente orgânico.	57
Figura 14. Ajuste do pH da amostra.....	58
Figura 15. Seleção da fase aceptora.....	59
Figura 16. Adição de sais na amostra.....	60
Figura 17. Tempo de extração.	61
Figura 18. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano e de ratos segundo o método desenvolvido.....	67

Figura 19. Cromatogramas referentes à análise de amostra de plasma fortificado com os enantiômeros de CQ, dos metabólitos e do padrão interno segundo o método desenvolvido.....	67
Figura 20. Gráfico da concentração plasmática <i>versus</i> tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos, após dose oral única de cloroquina racêmica.	68
Figura 21. Estruturas da mefloquina e do principal metabólito carboximefloquina.	70
Figura 22. Efeito da variação do pH da solução de eletrólitos.....	84
Figura 23. Efeito da variação da concentração da solução de eletrólitos.....	85
Figura 24. Resolução dos enantiômeros da MQ utilizando carboximetil- β -ciclodextrina como seletor quiral.	87
Figura 25. Seleção da concentração do seletor quiral.	88
Figura 26. Seleção da voltagem aplicada..	89
Figura 27. Seleção da temperatura aplicada.....	90
Figura 28. Seleção do tamanho do capilar.....	91
Figura 29. Seleção da solução da amostra.	92
Figura 30. Separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição com os aditivos dietilamina e ácido trifluoroacético.....	94
Figura 31. Separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição com o aditivo trifluoroacetato de amônio.	95
Figura 32. Separação dos enantiômeros da MQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo reverso de eluição..	96
Figura 33. Efeito da composição da fase móvel sobre a retenção (<i>k</i>) e resolução (<i>Rs</i>) dos enantiômeros da MQ e retenção de CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição.....	96
Figura 34. Separação otimizada dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição.....	97
Figura 35. Seleção do solvente orgânico.	100
Figura 36. Seleção da fase aceptora.....	101
Figura 37. Cromatograma obtido da análise de plasma humano fortificado com os enantiômeros da MQ e CMQ conforme o método desenvolvido.	102

Figura 38. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano e de ratos segundo o método desenvolvido.	107
Figura 39. Cromatograma obtido da análise de amostra de plasma de rato coletada 2 h após a administração oral de MQ e processada conforme o método desenvolvido.	107
Figura 40. Gráfico da concentração plasmática <i>versus</i> tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos após dose oral única de mefloquina racêmica.	108
Figura 41. Estruturas da artemisinina e dos derivados arteméter e diidroartemisinina.	111
Figura 42. Separação de ART e DHA empregando a coluna Si-Zr-PMTDS. .	121
Figura 43. Seleção do solvente orgânico.	123
Figura 44. Adição de sais na amostra.	124
Figura 45. Tempo de extração.	125
Figura 46. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano e de ratos segundo o método desenvolvido.	129
Figura 47. Cromatogramas referentes à análise de amostra de plasma fortificado com ART, DHA e padrão interno segundo o método desenvolvido.	129
Figura 48. Gráfico da concentração plasmática <i>versus</i> tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos após dose oral única de arteméter.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para análise enantiosseletiva da CQ, MQ e respectivos metabólitos em plasma.....	23
Tabela 2. Métodos descritos na literatura para a análise de ART e DHA em plasma.....	24
Tabela 3. Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM.....	41
Tabela 4. Fatores de retenção (k) e de separação (α) e resolução (R_s) dos analitos na coluna Chirobiotic V utilizando o modo polar-orgânico de eluição.	52
Tabela 5. Fatores de retenção (k) e de separação (α) e resolução (R_s) dos analitos na coluna Chirobiotic V utilizando o modo reverso de eluição com diferentes solventes orgânicos.....	53
Tabela 6. Procedimentos otimizados para LPME.....	61
Tabela 7. Linearidade do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.....	63
Tabela 8. Limite de quantificação do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.....	64
Tabela 9. Recuperações médias do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.....	64
Tabela 10. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.....	66
Tabela 11 Estudo de estabilidade (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.	66
Tabela 12. Concentrações avaliadas na validação do método de análise dos enantiômeros da MQ e CMQ em plasma.	82
Tabela 13. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição.	97
Tabela 14. Linearidade do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.	103
Tabela 15. Limite de quantificação do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.	103
Tabela 16. Recuperações médias do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.	104

Tabela 17. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.	105
Tabela 18. Estudo de estabilidade (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.....	106
Tabela 19. Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM..	115
Tabela 20. Concentrações avaliadas na validação do método de análise do ART e DHA em plasma.	119
Tabela 21. Linearidade do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.	126
Tabela 22. Limite de quantificação e recuperação absoluta do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.	126
Tabela 23. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.	128
Tabela 24. Estudo de estabilidade (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	fator de separação
ACN	acetonitrila
AGP	α_1 -glicoproteína ácida
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	ionização à pressão atmosférica
APCI	ionização química à pressão atmosférica
ART	arteméter
ATM	artemisinina
AUC	área sob a curva
BDCQ	bisdesetilcloroquina
C ₈	grupo octil
C ₁₈	grupo octadecil
CD	ciclodextrina
CE	eletroforese capilar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	dissociação induzida por colisão
CMQ	carboximefloquina
CN	grupo ciano
CQ	cloroquina
CSP	fase estacionária quiral
DCQ	monodesetilcloroquina
DEA	dietilamina
DHA	diidroartemisinina
E	erro relativo
ED	detector eletroquímico
EOF	fluxo eletroosmótico
ESI	eletronebulização
EtOH	etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	cromatografia gasosa

HAc	ácido acético
HCQ	hidroxicloroquina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IPA	isopropanol
k	fator de retenção
LLE	extração líquido-líquido
LPME	microextração em fase líquida
LQ	limite de quantificação
MeOH	metanol
MQ	mefloquina
MRM	monitoramento de reações múltiplas
MS	detector por espectrometria de massas
m/v	massa/volume
m/z	razão massa/carga
NH ₄ Ac	acetato de amônio
p. a.	pró análise
pK_a	- log da constante de ionização de um ácido
r^2	coeficiente de determinação
R_s	resolução
RSD	desvio-padrão relativo
SD	desvio-padrão
SIM	monitoramento de íons selecionados
Si-Zr-PMTDS	fase composta de sílica zircônio polimetiltetradecilsiloxano
SPE	extração em fase sólida
SPME	microextração em fase sólida
TFA	ácido trifluoroacético
TFANH ₄	trifluoroacetato de amônio
t_{max}	tempo necessário para atingir a concentração máxima
UI	unidades internacionais
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	detector por absorção ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Malária e fármacos antimaláricos	21
1.2	Técnicas analíticas atuais.....	24
1.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.....	25
1.2.2	Eletroforese capilar	27
1.3	Preparação de amostras de origem biológica	29
1.3.1	Microextração em fase sólida	30
1.3.2	Microextração em fase líquida	31
2	OBJETIVO GERAL	34
3	ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA CLOROQUINA E METABÓLITOS EM PLASMA.....	35
3.1	Introdução	35
3.2	Objetivo específico.....	38
3.3	Materiais e Métodos	38
3.3.1	Materiais	38
3.3.2	Equipamentos	40
3.3.3	Métodos	43
3.4	Resultados e Discussão	50
3.4.1	Separação empregando colunas derivadas de antibióticos.....	50
3.4.2	Otimização da extração empregando LPME.....	56
3.4.3	Validação do método desenvolvido	62
3.4.4	Aplicação do método desenvolvido.....	68
3.4.5	Avaliação do método desenvolvido.....	69
4	ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM PLASMA	70
4.1	Introdução	70
4.2	Objetivo específico.....	73
4.3	Materiais e Métodos	73
4.3.1	Materiais	73
4.3.2	Equipamentos	76
4.3.3	Métodos	78
4.4	Resultados e Discussão	83

4.4.1	Separação eletroforética da CMQ e dos enantiômeros da MQ.....	83
4.4.2	Separação empregando colunas cromatográficas quirais	93
4.4.3	Otimização da extração empregando LPME.....	98
4.4.4	Validação do método desenvolvido	102
4.4.5	Aplicação do método desenvolvido.....	106
4.4.6	Avaliação do método desenvolvido.....	109
5	ANÁLISE DO ARTEMÊTER E DIIDROARTEMISININA EM PLASMA ..	110
5.1	Introdução	110
5.2	Objetivo específico.....	113
5.3	Materiais e Métodos	113
5.3.1	Materiais	113
5.3.2	Equipamentos	115
5.3.3	Métodos	117
5.4	Resultados e Discussão	120
5.4.1	Detecção e separação cromatográfica de ART e DHA	120
5.4.2	Otimização da extração empregando LPME.....	122
5.4.3	Validação do método desenvolvido	125
5.4.4	Aplicação do método desenvolvido.....	130
5.4.5	Avaliação do método desenvolvido.....	131
6	CONCLUSÕES	132
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
	ANEXO A	148

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária e fármacos antimaláricos

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

Dentre as formas de combate à doença estão incluídos: uso de fármacos antimaláricos para profilaxia ou tratamento, medidas direcionadas ao vetor (uso de inseticidas) e desenvolvimento de vacinas. Atualmente, a utilização de fármacos antimaláricos representa a solução mais eficaz no controle da doença. No entanto, no decorrer das últimas décadas, o aparecimento e a propagação de parasitas resistentes à grande parte dos antimaláricos

disponíveis, têm-se revelado o principal obstáculo a uma eficiente contenção da malária. Dentre as alternativas para o tratamento da malária, destacam-se os fármacos quinolônicos (incluindo cloroquina - CQ e mefloquina - MQ) e, recentemente, artemisinina e derivados semi-sintéticos (arteméter, arteeter e artesunato).

Os fármacos da classe quinolônica são quirais e administrados na forma de racematos. Em vários estudos realizados, estes fármacos demonstraram propriedades cinética e dinâmica enantiosseletivas, podendo resultar em impactos na terapêutica (DUCHARME; FARINOTTI, 1996; BROCKS; MEHVAR, 2003). Logo, faz-se necessário o uso de métodos analíticos eficazes para a determinação dos enantiômeros destes fármacos e respectivos metabólitos em fluidos biológicos, possibilitando então o entendimento dos mecanismos de ação, otimização da terapêutica e redução de efeitos adversos decorrentes do uso.

Por outro lado, artemisinina e derivados semi-sintéticos são administrados na forma de enantiômero puro, visto que o fármaco original é obtido das folhas de *Artemisia annua* (VAN AGTMAEL et al., 1999). Dentre os derivados da artemisinina utilizados na prática clínica, destaca-se o arteméter (ART), um composto lipossolúvel disponível para administração oral e parenteral (NAVARATNAM et al., 2000). Segundo Meshnick et al. (1996), estudos farmacocinéticos destes fármacos têm sido dificultados pela ausência de metodologias adequadas de análise em fluidos biológicos. Portanto, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos é importante para a compreensão dos eventos relacionados à disposição cinética destes fármacos.

O desenvolvimento de métodos enantiosseletivos para análise de MQ, CQ e metabólitos justifica-se devido a observações prévias de que as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas são enantiosseletivas e em função da carência de métodos adequados descritos na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para análise enantiosseletiva da CQ, MQ e respectivos metabólitos em plasma.

<i>Analito</i>	<i>Extração</i>	<i>Análise</i>	<i>Deteção</i>	<i>Validação</i>	<i>Intervalo (ng mL⁻¹)</i>	<i>Comentários</i>	<i>Referência</i>
CQ e DCQ	LLE	HPLC	UV	Não	-	Coluna AGP	Ofori-Adjei et al., 1986
CQ e DCQ	LLE	CE	F	Não	2-1000	CD	Müller e Blashcke, 2000
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	100-1000	Troca de colunas	Gimenez et al., 1990
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	200-1500	Troca de colunas	Gimenez et al., 1993
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	94,5-756	Fase móvel quiral	Bergqvist et al., 1993
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	94,5-756	Derivação	Bergqvist et al., 1994
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	50-1000	Coluna AGP	Wallén et al., 1994
MQ	LLE	HPLC	UV	Sim	200-1500	Derivação	Souri et al., 1997
MQ	LPME	HPLC	UV	Sim	50-1500	LPME em três fases	Magalhães e Bonato, 2008

CQ: cloroquina; DCQ: monodesetilcloroquina; MQ: mefloquina; LLE: extração líquido-líquido; LPME: microextração em fase líquida; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; CE: eletroforese capilar; UV: detecção ultravioleta; F: detecção por fluorescência; AGP: α_1 -glicoproteína ácida; CD: ciclodextrinas.

Já o desenvolvimento de métodos para a determinação de ART e do metabólito diidroartemisinina (DHA) em fluidos biológicos é importante para a posterior aplicação em estudos farmacocinéticos (CHRISTEN; VEUTHEY, 2001). Embora alguns métodos descritos recentemente apresentem a espectrometria de massas (MS) como técnica de detecção, técnicas

tradicionais de preparação de amostras foram utilizadas no desenvolvimento destes métodos (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos descritos na literatura para a análise de ART e DHA em plasma.

<i>Analito</i>	<i>Extração</i>	<i>Análise</i>	<i>Detecção</i>	<i>Validação</i>	<i>Intervalo</i>	<i>Comentários</i>	<i>Referência</i>
ART e DHA	LLE	HPLC	UV	Sim	25-200	Derivação	Thomas et al., 1992
ART e DHA	LLE	HPLC	UV	Sim	50-600	Derivação	Muhia et al., 1994
ART e DHA	LLE	HPLC	ED	Sim	15-240	Desaeração	Navaratnam et al., 1995
ART e DHA	LLE	HPLC	ED	Sim	10-640	Desaeração	Karbwang et al., 1997
ART e DHA	LLE	HPLC	ED	Sim	10-200	Desaeração	Sandrenan et al., 1997
ART e DHA	LLE	HPLC	ED	Sim	10-200	Desaeração	Van Agtmael et al., 1998
ART e DHA	SPE	GC	MS	Sim	5-250	Derivação	Mohamed et al., 1999
ART e DHA	LLE	HPLC	MS	Sim	5-200	APCI	Souppart et al., 2002
ART e DHA	LLE	HPLC	MS	Sim	10-1000	ESI	Peys et al., 2005
ART e DHA	LLE	HPLC	MS	Sim	5-500	APCI	Shi et al., 2006
ART e DHA	SPE	HPLC	MS	Sim	1,4-500	ESI	Hanpithakpong et al., 2009

Intervalo de concentrações em ng mL⁻¹; ART: arteméter; DHA: diidroartemisinina; LLE: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; GC: cromatografia gasosa; UV: detector por absorção ultravioleta; ED: detector eletroquímico; MS: detector por espectrometria de massas; APCI: interface de ionização química à pressão atmosférica; ESI: interface de eletronebulização.

1.2 Técnicas analíticas atuais

Uma etapa crucial para a investigação de efeitos farmacológicos e toxicológicos de fármacos quirais ou não é a disponibilidade de técnicas

analíticas que permitam a resolução e quantificação destes em matrizes biológicas. Dentre as técnicas de análise utilizadas atualmente, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS-MS) e a eletroforese capilar (CE), pela versatilidade e poder de resolução demonstrados (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003).

1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica bem estabelecida na análise de fármacos em fluidos biológicos, tendo como vantagem, em relação à cromatografia gasosa (GC), a possibilidade de separação de compostos não-voláteis ou termolábeis.

Tratando-se de análise aquiral, grande parte dos métodos descritos na literatura utiliza HPLC em fase reversa para determinação de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos. As inovações nesta área são constantes, incluindo a busca de novos materiais de suporte das colunas e de novas formas de tratamento dos grupos silanóis residuais, os quais prejudicam a separação de compostos básicos devido à ocorrência de interações secundárias, bem como a introdução de novas fases estacionárias, visando expandir a aplicação da técnica em uma ampla faixa de pH (SILVA et al., 2004). Ultimamente, o uso de partículas de tamanho reduzido ($< 2 \mu\text{m}$) e sistemas capazes de suportar altas pressões ($> 650 \text{ atm}$) originou a denominada cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), a qual pode gerar métodos com menor tempo de análise, maior poder de resolução e elevada detectabilidade (SWARTZ, 2005).

Outro grande aliado na análise de fármacos em materiais biológicos foi o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS). Este acoplamento tem como objetivo principal agregar as vantagens oferecidas por estas técnicas em separado: alta seletividade e detectabilidade; possibilidade de desenvolver métodos com tempo de análise reduzido e, portanto, com alta capacidade de processamento de amostras; obtenção de informações adicionais relacionadas à estrutura dos analitos de interesse (ARDREY, 2003; VOGESER; SEGER, 2008). Dentre as várias estratégias utilizadas para o acoplamento das duas técnicas, destaca-se o uso das interfaces de ionização à pressão atmosférica (API) como a eletronebulização (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI), resultando em métodos mais seletivos e com menores limites de detecção e quantificação (MARQUET, 2002; ERNY; CIFUENTES, 2006). As análises dos íons obtidos nas diferentes interfaces em MS podem ser executadas utilizando-se um ou mais analisadores de massas, sendo que os do tipo *ion trap*, *time of flight* e quadrupolo são os mais utilizados (ARDREY, 2003). Para análises quantitativas em materiais biológicos, o monitoramento de íons selecionados (SIM) ou o monitoramento de reações múltiplas (MRM), o qual requer o uso de dois estágios distintos de MS (LC-MS-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*) são comumente empregados nos modos positivo ou negativo (BAKHTIAR; MAJUMDAR, 2007).

Para análise de fármacos quirais, o emprego de CSPs é bastante difundido. Nas últimas duas décadas, o número de CSPs disponíveis comercialmente aumentou consideravelmente, permitindo a análise da maioria dos racematos existentes (THOMPSON, 2005). Diferentes tipos de seletores

quirais têm sido utilizados na preparação de CSPs, dentre eles: polissacarídeos e derivados, ciclodextrinas e derivados, proteínas, antibióticos macrocíclicos e outros (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002). Os seletores quirais são derivados e incorporados ou imobilizados na superfície de um suporte (geralmente sílica gel), atuando como discriminadores quirais *in situ* durante o processo. Para tanto, o seletor quiral deverá apresentar afinidade seletiva para um dos enantiômeros em particular (HAGINAKA, 2002).

A maioria dos métodos relatados na literatura para a determinação de enantiômeros em fluidos biológicos emprega o modo de eluição normal, o qual apresenta alta concentração de solventes orgânicos apolares e, no intuito de aumentar a resposta do analito e diminuir o risco de explosão no uso de elevadas temperaturas (principalmente em APCI), o uso de infusão pós-coluna de soluções aquosas tem superado este problema (PÉREZ; BARCELÓ, 2008).

1.2.2 Eletroforese capilar

Na década passada, CE emergiu como alternativa eficaz e promissora para determinação de fármacos em fluidos biológicos, apresentando vantagens como separações com alta eficiência, tempos de análise curtos, pequena demanda de amostra e custos reduzidos (THORMANN, 2002). É fundamentada na migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, obtido em um capilar de sílica fundida posicionado entre dois eletrodos, conforme visto na Figura 1 (TAVARES, 1996). Pode ser utilizada em vários modos de separação: eletroforese capilar em zona, eletrocromatografia micelar, eletroforese capilar em gel, focalização isoeletrica capilar e isotacoforese capilar (SILVA, 2007).

Figura 1. Instrumentação básica utilizada em eletroforese capilar.

Para análise de fármacos quirais, a adição de seletores quirais na concentração adequada à solução eletrolítica juntamente com o ajuste de outros parâmetros importantes (por exemplo, pH e concentração da solução-tampão, voltagem e temperatura aplicadas) pode oferecer separações inigualáveis, a partir de interações diferenciais com os enantiômeros estudados (VESPALEC; BOČEK, 1999).

Dentre os vários seletores quirais utilizados em CE, as ciclodextrinas (CDs) são os mais empregados. Devido a grande variedade de CDs naturais ou derivatizadas atualmente, vários fármacos e metabólitos quirais com diferentes características vêm sendo separados. Além das CDs, outros seletores quirais estão disponíveis, como: éteres de coroa, polissacarídeos, antibióticos macrocíclicos, surfactantes quirais e complexos metálicos quirais (GÜBITZ; SCHMID, 2008).

Diferentemente dos outros modos de CE, a eletrocromatografia capilar (CEC) combina as vantagens das CSPs encontradas em HPLC com a elevada eficiência alcançada em CE e, portanto, tem possibilitado a resolução de vários fármacos (WISTUBA; SCHURIG, 2000). Recentemente, a introdução de CE em meio não-aquoso, a qual utiliza solventes orgânicos no lugar de soluções

aquosas, aumentou a lista de fármacos passíveis de serem analisados por CE, principalmente pela resolução de problemas relacionados a pobre solubilidade de alguns analitos em água (GEISER; VEUTHEY, 2007).

1.3 Preparação de amostras de origem biológica

Apesar do fantástico poder analítico destas técnicas, a determinação de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos (sangue total, plasma, líquor, etc.) é dificultada pela alta concentração de proteínas e compostos endógenos na matriz e frequentemente baixa concentração dos compostos de interesse. Portanto, a análise cromatográfica ou eletroforética de substâncias presentes em fluidos biológicos, em geral, requer um pré-tratamento da amostra, que permita a extração e isolamento dos analitos de interesse, de modo que seja efetuada sua determinação qualitativa e quantitativa por intermédio de uma técnica analítica adequada. A extração visa a remoção dos analitos da matriz, enquanto a etapa de isolamento (*clean-up*) objetiva a remoção de interferentes. Na maioria dos métodos clássicos de preparação de amostras (extração líquido-líquido – LLE e extração em fase sólida - SPE), as duas etapas geralmente são separadas, tornando os procedimentos tediosos, caros e acarretando grande uso de solventes orgânicos (LANÇAS, 2004). Por outro lado, dentre as tendências recentes no preparo de amostras, estão incluídas: miniaturização, automação e uso reduzido de solventes orgânicos (KATAOKA, 2003).

Dentre as propriedades ideais de um método de extração, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, seletividade e alta recuperação do

analito de interesse. Atualmente, as técnicas de preparação de amostras mais utilizadas são LLE e a SPE (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Destacam-se também, os avanços obtidos com duas técnicas de extração miniaturizada: a microextração em fase sólida e a microextração em fase líquida (SAITO; JINNO, 2003).

1.3.1 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (SPME), técnica relativamente recente, tem como dispositivo básico um bastão de fibra ótica, de sílica fundida, recoberto com um fino filme de polímero ou de adsorvente (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A afinidade do material de recobrimento da fibra para um determinado analito é o fator mais importante nesta técnica. Na SPME, as moléculas se deslocam na matriz e penetram no material de recobrimento da fibra, sendo estabelecido um equilíbrio de partição do analito entre a fibra e o meio que o envolve. A SPME pode ser utilizada em dois modos: direto, no qual o dispositivo entra em contato com a matriz (amostras líquidas) ou *headspace*, empregado para análise de compostos de média e alta volatilidade, no qual a fibra é exposta ao *headspace* de amostras gasosas, líquidas ou sólidas, conforme visto na Figura 2 (ULRICH, 2000). Para a retirada do analito retido na fase extratora é necessária a etapa de dessorção, a qual deve ser otimizada durante o desenvolvimento do método e, dependendo da técnica analítica utilizada, pode ocorrer através da imersão da fibra em um solvente orgânico apropriado ou na própria fase móvel (no caso de HPLC) ou ainda empregando-se a temperatura (no caso de GC) (LANÇAS, 2004).

Figura 2. Principais modos empregados na microextração em fase sólida: extração direta (esquerda) e extração via *headspace* (direita).

1.3.2 Microextração em fase líquida

Dentre as várias tentativas para miniaturização da LLE, a microextração em fase líquida empregando fibras ocas (LPME) se destaca entre as demais, devido combinar o conceito de extrações com membranas ao uso reduzido de razões solvente orgânico/fase aquosa, conservando os princípios observados na LLE convencional (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Nesta técnica, considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes, uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (Figura 3) é impregnada com solvente orgânico e o lúmen é preenchido com microlitros de fase aceptora (microextrato) (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006). Com isso, o microextrato não entra em contato direto com a amostra, podendo-se aplicar agitação sem prejuízo da fase aceptora e, devido à porosidade da membrana empregada ($0,2\ \mu\text{m}$), macromoléculas não são extraídas, permitindo eficaz limpeza da amostra (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). Além do mais, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o uso único e,

portanto, evita-se problemas de contaminação, comumente observados nas outras técnicas de extração com membranas (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; LEE et al., 2008).

Figura 3. Fotografias da configuração tradicional empregada na microextração em fase líquida.

A LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão, conforme visto na Figura 4 (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2005). Em duas fases, o solvente orgânico impregnado na membrana preenche também o lúmen da mesma. Desta forma, o extrato é inteiramente compatível com GC. Este modo é geralmente empregado na extração de fármacos e metabólitos de caráter neutro ou de baixa polaridade. Em três fases, o solvente orgânico é depositado nos poros da membrana e uma fase aquosa com pH definido ocupa o lúmen da mesma. O processo em três fases é indicado para analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis (ácidos ou bases fracas). Após a extração,

a fase aceptora aquosa obtida pode ser prontamente introduzida em CE em meio aquoso ou HPLC em fase reversa. Para analitos altamente hidrofílicos, que encontrariam dificuldades em serem extraídos na membrana orgânica apenas pelo processo de difusão, pode-se utilizar carreadores de carga oposta ao do composto em questão, possibilitando a formação de pares iônicos passíveis de partição no solvente orgânico impregnado na membrana capilar (HO et al., 2003).

Figura 4. Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida: duas fases (esquerda) e três fases (direita).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o emprego da microextração em fase líquida (LPME) na preparação de amostras para a determinação de alguns fármacos antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma.

3 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA CLOROQUINA E METABÓLITOS EM PLASMA

3.1 Introdução

Apesar do surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes, especialmente de *P. falciparum*, a cloroquina (CQ) tem sido o principal fármaco antimalárico utilizado na profilaxia e terapêutica da doença nas últimas décadas (SCHLITZER, 2008). Recentemente, vem sendo empregada também no tratamento de doenças autoimunes (WOZNIACKA; McCAULIFFE, 2005).

Assim como outros antimaláricos, CQ (Figura 5) é um fármaco quiral utilizado na forma de racemato (BROCKS; MEHVAR, 2003). Vários ensaios foram realizados na tentativa de avaliar a enantiosseletividade na dinâmica do fármaco (DUCHARME; FARINOTTI, 1996). Em um estudo *in vitro*, (+)-(S)-CQ apresentou maior atividade contra cepas de *P. vinckei* que (-)-(R)-CQ (FINK; MINET; NICKEL, 1979). Diferenças de atividade e toxicidade entre os enantiômeros da CQ também foram relatadas em um estudo de malária experimental em camundongos (HABERKORN; KRAFT; BLASCHKE, 1979). Mais tarde, Tagoe e Ofori-Adjei (1995) verificaram perfis distintos de embriotoxicidade dos enantiômeros em ratos. No entanto, não houve diferença de atividade significativa entre os enantiômeros contra cepas de *P. falciparum* resistentes ou não (FU et al., 1986). Donatelli et al. (1994) relataram maior inibição da enzima histamina N-metiltransferase isolada do cérebro e fígado humanos por (+)-(S)-CQ.

Figura 5. Estruturas da cloroquina (esquerda) e dos metabólitos monodesetilcloroquina (meio) e bisdesetilcloroquina (direita).

A ligação às proteínas plasmáticas, parâmetro importante na disposição dos fármacos no organismo, parece ser enantiosseletiva. Em estudos de diálise e microfiltração, (+)-(S)-CQ apresentou maiores taxas de ligação à albumina e AGP que (-)-(R)-CQ (OFORI-ADJEI et al., 1986; AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1993). Além disso, a ligação do fármaco análogo hidroxicloroquina (HCQ) aos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) foi enantiosseletiva, favorecendo (-)-(R)-HCQ (BROCKS et al., 1994).

O fármaco apresenta metabolismo hepático pelas enzimas do citocromo P450, principalmente as isoformas CYP2C8, CYP3A4 e CYP2D6 (PROJEAN et al. 2003). Após administração oral ou parenteral, CQ é rapidamente biotransformada em monodesetilcloroquina (DCQ) e bisdesetilcloroquina (BDCQ), ambos farmacologicamente ativos e produtos de dealquilação da amina terciária (SALAKO; AJAYI, 1987; DUCHARME; FARINOTTI, 1997). Augustijns et al. (1999) verificaram enantiosseletividade no metabolismo do fármaco em microsossomos hepáticos de ratos.

CQ e metabólitos apresentam farmacocinética enantiosseletiva em humanos e animais de experimentação. Após administração única dos enantiômeros em separado ou do racemato a voluntários sadios, foi observada disposição cinética enantiosseletiva com maiores concentrações de (-)-(R)-CQ (AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1993; OFORI-ADJEI et al., 1986). Em coelhos, (-)-

(*R*)-CQ apresentou maior meia-vida de eliminação juntamente com maior área sob a curva (AUC) de (+)-(*S*)-DCQ (AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1992).

HPLC é a técnica de escolha para a determinação de CQ e metabólitos em fluidos biológicos. Vários métodos empregando a técnica em fase normal e reversa são relatados na literatura para a análise aquiral (AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1990; CHAULET et al., 1991; WALKER; ADEMOWO, 1996). Porém, apenas dois métodos foram descritos para a determinação enantiosseletiva destes analitos (Tabela 1). Primeiro, Ofori-Adjei et al. (1986) empregaram uma coluna contendo AGP como seletor quiral para separação dos enantiômeros em fase reversa. Porém, o método não diferencia fármaco e metabólitos, necessitando da prévia separação em coluna não quiral e coleta dos analitos para posterior quantificação dos enantiômeros em plasma e urina, tornando-o de difícil aplicação. Mais tarde, Aubry et al. (1992) também obtiveram a separação utilizando coluna com fase protéica e formularam um possível mecanismo de discriminação quiral. No entanto, os autores descreveram somente a análise de soluções-padrão. Recentemente, Müller e Blaschke (2000) relataram a separação enantiomérica de CQ e DCQ utilizando CE contendo CDs modificadas como seletores quirais (Tabela 1). No entanto, não há dados referentes à validação destas metodologias, condição fundamental para a aplicação das mesmas.

3.2 Objetivo específico

Desenvolver e validar método de análise enantiosseletiva da CQ e metabólitos em plasma empregando LPME e HPLC com aplicação em um estudo piloto de disposição cinética em ratos.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila) foram grau cromatográfico, obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e EM Science (Gibbstown, EUA). Ácido acético glacial (99,7%) e dietilamina, empregados como aditivos na fase móvel, foram obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e Fluka (Buchs, Suíça), respectivamente.

Os reagentes empregados no preparo das soluções-tampão utilizadas (acetato de amônio), além do sal cloreto de sódio, foram grau p.a., obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico (37%) foram adquiridos da Spectrum Chemical Corp. (Gardena, EUA) e J. T. Baker (Phillipsburg, EUA), respectivamente. A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema Milli-Q-Plus[®] (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

Os solventes utilizados na otimização do método empregando LPME foram éter diexílico (Alfa Aesar – Johnson Matthey Company, Ward Hill, EUA), acetato de dodecila e *n*-octanol, ambos provenientes da Sigma (St. Louis, EUA), todos de grau cromatográfico ou analítico.

3.3.1.2 Soluções-padrão

As soluções estoque de CQ (difosfato de cloroquina, Sigma, St. Louis, EUA), DCQ e BDCQ (gentilmente cedidos pelo Dr. Michael Green - Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA) racêmicas foram preparadas no sistema metanol:água (50:50, v/v) na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de uso por diluição no mesmo sistema, nas concentrações de 25 e $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para avaliação das colunas cromatográficas e otimização do método de extração. Da mesma forma, soluções-padrão nas concentrações de 0,4, 0,8, 2, 4, 8, 20 e $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de CQ e metabólitos foram preparadas para os experimentos de validação do método. Para obtenção das amostras-controle, foram preparadas soluções nas concentrações de 1,2, 16 e $36 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de CQ e metabólitos. Solução-padrão de HCQ racêmica, obtida de Sanofi Winthrop Pharmaceuticals (Rensselaer, EUA) e utilizada como padrão interno (Figura 6), foi preparada na concentração de $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ no mesmo sistema de solventes. Todas as soluções foram estocadas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz durante todo o processo.

Figura 6. Estrutura da hidroxiclороquina, utilizada como padrão interno.

3.3.1.3 Amostras de plasma

No desenvolvimento e validação do método, utilizou-se amostras de plasma humano livres dos analitos, obtidas junto ao Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de

São Paulo, armazenadas a -20 °C até o momento da análise. As amostras em uso foram inicialmente descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas durante 10 min a 2000 *g* para a remoção de partículas suspensas. Para aplicação do método, optou-se por realizar experimentos em ratos ao invés de voluntários sadios ou pacientes, devido a maior facilidade em aprovação do estudo junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

3.3.1.4 Animais

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

3.3.2 Equipamentos

3.3.2.1 Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico usado foi um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba modelo LC10AS, forno modelo CTO-10 AS, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 µL, um detector por absorbância no UV-Vis modelo SPD-A e um sistema controlador modelo SCL-10ADvp. Para adição pós-coluna de água, foi utilizada uma bomba auxiliar do mesmo modelo descrito acima operando na vazão de 0,3 mL min⁻¹.

O sistema de detecção por MS utilizado foi o Quattro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface ESI. As análises foram executadas no modo positivo. O efluente do HPLC foi dividido por uma válvula (Upchurch Scientific, Oak Harbor, EUA) e apenas um fluxo de aproximadamente $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi introduzido no capilar de aço inoxidável do MS. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 80 e 250 °C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem e de nebulização e o argônio como gás de colisão. A aquisição e tratamento de dados foram executados através do programa MassLynx, versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

As condições de otimização do MS-MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão ($50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão na vazão de $20 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. As análises foram executadas no modo MRM. As condições otimizadas para cada analito estão descritas na Tabela 3:

Tabela 3. Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM.

Analito	Reação monitorada	Voltagem do cone (kV)	Energia de colisão (eV)
CQ	$320 \rightarrow 247$	30	20
DCQ	$292 \rightarrow 114$	30	23
BDCQ	$264 \rightarrow 179$	30	23
HCQ	$335 \rightarrow 247$	20	25

MRM, monitoramento de reações múltiplas.

3.3.2.2 Equipamentos e materiais utilizados em LPME

Durante a etapa de preparação das amostras empregando a LPME, foram utilizados um agitador de tubos AP56 (Phoenix, Araraquara, Brasil) e um

agitador magnético obtido da Corning Inc., modelo PC-210 (Corning, EUA). Outros materiais empregados na otimização do procedimento de LPME incluíram: frascos âmbar de vidro com capacidade para 4 mL (Supelco, Bellefonte, EUA), membranas capilares de polipropileno, modelo Accurel PP Q 3/2 (600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura da parede e 0,2 µm de tamanho dos poros, Membrana, Wuppertal, Alemanha), barras de agitação magnética, de dimensões 10 mm x 3 mm (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e microseringas (modelo LC FN – Agilent Technologies, Palo Alto, EUA e modelo 1725RN – Hamilton, Reno, EUA), ambas com capacidade para 250 µL. Durante a validação e aplicação do método, ponteiras de aplicação de eletroforese em gel (Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, EUA) foram utilizadas para o suporte das membranas no lugar das seringas e o agitador Vibrax VXR (IKA, Staufen, Alemanha) foi empregado para agitação das amostras.

3.3.2.3 Outros equipamentos

Para verificação do comprimento de onda de absorção máxima dos analitos foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis-NIR, modelo U-3501 (Hitachi, Tokyo, Japão), juntamente com celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Também foi empregado um pHmetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA) para medição do pH das soluções-tampão.

3.3.2.4 Colunas cromatográficas quirais e de guarda

Para a escolha de uma coluna apropriada e eficiente para a separação dos analitos, foram avaliadas colunas cromatográficas quirais baseadas em derivados de antibióticos: Chirobiotic V (vancomicina) e Chirobiotic T (teicoplanina), ambas com partículas de 5 μm e provenientes da Astec Inc. (Whippany, EUA). Para análise de amostras de plasma, utilizou-se uma coluna de guarda CN LiChrospher, com 4 x 4 mm e partículas de 5 μm , proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.3.3 Métodos

3.3.3.1 Avaliação das colunas cromatográficas quirais

Para a eficaz resolução dos analitos, fez-se necessária a avaliação das colunas cromatográficas citadas acima em dois modos: polar orgânico, utilizando-se solventes orgânicos polares contendo aditivos, ou modo reverso, com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico polar. As fases móveis empregadas no modo polar orgânico foram preparadas pela simples mistura dos componentes com posterior homogeneização. As fases móveis empregadas no modo reverso foram previamente filtradas a vácuo através de uma membrana da Millipore (São Paulo, Brasil) com poros de 0,45 μm e depois desgaseificadas no ultrassom por 5 min.

Para a avaliação das colunas cromatográficas, 25 μL das soluções-padrão dos analitos, na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram transferidos para tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL da fase móvel e 50 μL foram cromatografados. A detecção foi feita empregando o detector UV-Vis, em

343 nm. As injeções foram realizadas somente após o condicionamento da coluna com a fase móvel e estabilização da linha de base. No final da avaliação diária, procedeu-se a lavagem das colunas operando no modo polar-orgânico com o solvente orgânico utilizado na fase móvel isento de aditivos. Já para as colunas avaliadas no modo reverso de eluição, realizou-se a lavagem com solvente orgânico e água, na mesma proporção empregada na fase móvel.

Alguns parâmetros cromatográficos, como fatores de retenção (k) e de separação (α) e resolução (R_s) foram calculados de acordo com o método descrito na *United States Pharmacopeia* (USP) para avaliação das colunas cromatográficas quirais utilizadas.

3.3.3.2 Ordem de eluição dos enantiômeros

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

3.3.3.3 Microextração em fase líquida

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando-se alíquotas de 1 mL de plasma fortificado com 25 µL de solução-padrão de cada analito, além de 25 µL de solução-padrão de HCQ racêmica (25 µg mL⁻¹), usada como padrão interno. Fez-se diluição com água purificada para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma livres dos analitos, bem como alíquotas de água purificada também foram processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Para cada extração, uma seção de membrana capilar de polipropileno, de 7 cm de comprimento e fixada nas extremidades com o auxílio de microseringas foi imersa durante 5 s no solvente orgânico para sua deposição nos poros da membrana. Em seguida, o excesso de solvente foi retirado por imersão da membrana em água e banho ultrassônico durante 10 s. Após a impregnação, cerca de 20 µL de fase aceptora (neste caso, uma solução aquosa) foram introduzidos no interior da membrana capilar, utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar então foi imersa na fase doadora (matriz contendo os analitos) e a extração foi iniciada sob agitação magnética (1200 rpm). Após o tempo necessário de extração, a fase aceptora foi retirada da membrana usando outra microseringa e transferida para um tubo de ensaio âmbar. Finalmente, o extrato foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, sendo então dissolvido em 70 µL de fase móvel e 50 µL injetados no sistema cromatográfico.

Na avaliação do procedimento de extração empregando LPME em três fases, a influência dos seguintes parâmetros foi avaliada: tipo de solvente

orgânico, concentração de hidróxido de sódio na fase doadora, concentração de ácido trifluoroacético da fase aceptora, adição de sais na fase doadora e tempo de extração.

Na validação e aplicação do método desenvolvido, passou-se a utilizar membranas de 15 cm de comprimento suportadas por duas ponteiros ao invés de seringas, bem como agitação tipo *vortex* a 1500 rpm durante 30 min de extração (Figura 7).

Figura 7. Fotografias da configuração desenvolvida para microextração em fase líquida.

3.3.3.4 Validação do método desenvolvido

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

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos por algumas agências regulamentadoras e recomendações presentes na literatura para análise de fármacos em fluidos biológicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2003; *Food and*

Drug Administration - FDA, 2001; HUBERT et al., 1999; ROSING et al., 2000; SHAH et al., 2000).

As curvas analíticas foram realizadas em triplicata utilizando alíquotas de plasma fortificadas nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng mL⁻¹ de cada enantiômero de CQ e metabólitos e adicionadas de 25 µL da solução de HCQ (25 µg mL⁻¹), sendo submetidas ao processo de extração e análise cromatográfica. As equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (r^2) foram obtidos das razões de alturas dos picos no eixo das ordenadas plotadas em função das respectivas concentrações plasmáticas no eixo das abcissas. Nas condições avaliadas, os enantiômeros da HCQ também são separados e o primeiro pico no cromatograma foi utilizado nos cálculos.

A verificação da linearidade das curvas analíticas foi realizada através da análise de variância (ANOVA) da equação de regressão pelo teste do ajuste do modelo linear (*lack-of-fit*), com nível de significância estabelecido em 5%. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa SPSS for Windows, versão 9.0.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração quantificada de cada enantiômero com precisão e exatidão igual ou inferior a 20%. Foram avaliadas quintuplicatas de amostras fortificadas com CQ e metabólitos na concentração de 5 ng de cada enantiômero por mL de plasma, adicionadas de padrão interno, submetidas ao procedimento de extração e analisadas utilizando-se de curvas analíticas processadas de forma idêntica.

Para a determinação da recuperação do método, amostras de plasma previamente fortificadas com soluções-padrão de CQ e metabólitos nas concentrações de 15, 200 e 500 ng de cada enantiômero por mL de plasma

foram analisadas pelo método de extração proposto (triplicata para cada concentração). A concentração obtida destas amostras foi calculada empregando-se curvas analíticas construídas com dados resultantes da análise direta de soluções-padrão não submetidas ao processo de extração, em duplicata para cada concentração. Vale ressaltar que a recuperação foi avaliada adicionando-se o padrão interno (HCQ) apenas aos extratos obtidos no procedimento de preparação das amostras.

Para a avaliação da precisão e exatidão, foram preparadas amostras de 20 mL de plasma fortificadas nas concentrações de 15, 200 e 450 ng de cada enantiômero por mL de plasma. Essas amostras foram divididas em alíquotas de 6 mL, acondicionadas em tubos âmbar, tampados, protegidos da luz e estocados sob refrigeração (-20 °C) até o momento da análise. A precisão e exatidão do método desenvolvido foram avaliadas através de estudos intra e interensaios.

A precisão e exatidão intraensaio foram verificadas analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 15, 200 e 450 ng de cada enantiômero por mL de plasma, em quintuplicata para cada concentração. As concentrações dos enantiômeros nas amostras foram determinadas empregando uma curva analítica preparada no mesmo dia.

O estudo da precisão e exatidão interensaios foi realizado analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 15, 200 e 450 ng de cada enantiômero por mL de plasma, em quintuplicata para cada concentração, durante três dias consecutivos. Da mesma forma, para cada dia de análise, empregou-se uma nova curva analítica, conforme descrito anteriormente.

O estudo de estabilidade foi avaliado através de ciclos de congelamento e descongelamento das amostras bem como na manutenção das mesmas à temperatura ambiente. Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, amostras de plasma fortificadas nas concentrações baixa (15 ng de cada enantiômero por mL de plasma) e alta (450 ng de cada enantiômero por mL de plasma), em triplicata, foram congeladas a -20 °C por 24 h e então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20 °C por 12 h. O ciclo de congelamento e descongelamento foi repetido novamente, quantificando-se o fármaco presente nas amostras após o terceiro ciclo.

Para a realização do estudo de estabilidade à temperatura ambiente, amostras de plasma fortificadas nas concentrações baixa (15 ng de cada enantiômero por mL de plasma) e alta (450 ng de cada enantiômero por mL de plasma), em triplicata, foram descongeladas a temperatura ambiente e mantidas durante 12 h sobre a bancada de trabalho, quantificando-se o fármaco após o término do tempo. Os resultados dos testes de estabilidade foram comparados com os resultados de amostras recém preparadas e analisadas pelo teste *t* de Student, com nível de significância de 5%.

3.3.3.5 Aplicação do método desenvolvido

Os animais foram mantidos em jejum de 12 h, recebendo apenas água e, ao final do período, receberam difosfato de cloroquina racêmico dissolvido em água na dose única de 20 mg/kg por via oral (gavagem). Alimentação foi oferecida aos animais, aproximadamente 1 h após a administração do fármaco.

As amostras de sangue (6 mL) foram colhidas por decaptação nos tempos 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h após a administração ($n = 3$ para cada tempo de coleta), utilizando-se heparina (Liquemine 25.000 UI, Roche) como anticoagulante. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 *g*, 15 min) foram armazenados a -20 °C e sob proteção da luz até o momento da análise.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela CEUA do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 *Separação empregando colunas derivadas de antibióticos*

A resolução simultânea de CQ e respectivos metabólitos foi avaliada empregando duas colunas com CSPs baseadas em antibióticos (Chirobiotic V e Chirobiotic T). Na seleção da coluna mais adequada para o método a ser desenvolvido, variou-se apenas a composição da fase móvel, de acordo com a solubilidade e a estrutura dos analitos.

Primeiramente, as colunas foram avaliadas no modo polar-orgânico de eluição, o qual geralmente oferece melhores separações, segundo o fabricante destas colunas. De acordo com a Figura 8, a melhor separação dos analitos foi alcançada utilizando a coluna Chirobiotic V, a qual contém CSP baseada no antibiótico vancomicina. Conforme descrito por Desai e Armstrong (2004), a separação dos enantiômeros da CQ já havia sido obtida nesta coluna anteriormente. Desta forma, passamos a utilizar esta coluna nos estudos posteriores.

Figura 8. Separação dos enantiômeros da CQ (esquerda), DCQ (meio) e BDCQ (direita) empregando as colunas Chirobiotic T (acima) e Chirobiotic V (abaixo) no modo polar-orgânico de eluição. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol-ácido acético glacial-dietilamina (100:0,5:0,5, v/v/v); vazão: 1 mL min⁻¹; detecção UV em 343 nm.

A retenção e resolução dos analitos foi bastante sensível à composição da fase móvel, principalmente da razão dos aditivos ácido acético glacial (HAc) e dietilamina (DEA). De acordo com a Tabela 4, houve diminuição da retenção de todos os analitos com o aumento da concentração de DEA na fase móvel. O aditivo básico compete com os analitos pelos grupos silanóis residuais, diminuindo então a retenção dos mesmos. Por outro lado, a resolução dos enantiômeros parece depender da presença de HAc na fase móvel. Havendo excesso de ácido na fase móvel, o analito básico estará predominantemente na forma ionizada e passível de formar interações dipolares com os centros quirais disponíveis.

Tabela 4. Fatores de retenção (k) e de separação (α) e resolução (R_s) dos analitos na coluna Chirobiotic V utilizando o modo polar-orgânico de eluição.

Fase móvel	CQ			DCQ			BDCQ		
	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s
MeOH-HAc-DEA (100:0,1:0,1)	12,3	1,26	2,95	16,0	1,39	3,53	19,1	1,20	1,52
MeOH-HAc-DEA (100:0,5:0,5)	3,7	1,24	1,91	3,8	1,39	3,08	4,3	1,23	1,61
MeOH-HAc-DEA (100:0,5:0,25)	10,6	1,32	2,80	11,3	1,46	3,37	13,3	1,26	2,05
MeOH-HAc-DEA (100:0,25:0,5)	0,4	1,00	-	1,0	1,1	0,77	1,1	1,00	-
MeOH-ACN-HAc-DEA (95:5:0,5:0,5)	2,6	1,26	1,83	2,9	1,37	2,89	3,5	1,20	1,46
MeOH-ACN-HAc-DEA (90:10:0,5:0,5)	2,5	1,20	1,80	2,8	1,35	2,82	3,5	1,17	1,40

CQ, cloroquina; DCQ, monodesetilcloroquina; BDCQ, bisdesetilcloroquina; k_1 , fator de retenção do primeiro enantiômero eluído; MeOH, metanol; HAc, ácido acético glacial; DEA, dietilamina; ACN, acetonitrila.

A melhor separação no modo polar-orgânico de eluição foi obtida utilizando-se a fase móvel metanol-acetonitrila (90:10, v/v) acrescida de 0,5% de HAc e DEA, conforme mostra a Figura 9. Embora tenha sido alcançada a separação dos enantiômeros de cada analito, não foi possível a discriminação entre fármaco e metabólitos, ocorrendo coeluição dos mesmos.

Figura 9. Melhor separação dos enantiômeros da CQ (esquerda), DCQ (meio) e BDCQ (direita) empregando a coluna Chirobiotic V. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol-acetonitrila-ácido acético glacial-dietilamina (90:10:0,5:0,5, v/v/v/v); vazão: 1 mL min⁻¹; detecção UV em 343 nm.

A coluna Chirobiotic V também foi avaliada no modo reverso de eluição. De acordo com a Tabela 5, diferentes perfis de retenção e de resolução dos analitos foram observados utilizando-se vários modificadores orgânicos.

Tabela 5. Fatores de retenção (k) e de separação (α) e resolução (R_s) dos analitos na coluna Chirobiotic V utilizando o modo reverso de eluição com diferentes solventes orgânicos.

Fase móvel	CQ			DCQ			BDCQ		
	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s
NH ₄ Ac 20 mmol L ⁻¹ pH 4,0-MeOH (80:20)	7,8	1,06	0,37	5,6	1,12	0,94	4,2	1,11	1,00
NH ₄ Ac 20 mmol L ⁻¹ pH 4,0-EtOH (80:20)	5,4	1,09	0,46	4,3	1,11	0,94	3,2	1,12	1,00
NH ₄ Ac 20 mmol L ⁻¹ pH 4,0-IPA (80:20)	4,5	1,11	0,47	3,6	1,16	0,89	2,9	1,13	0,94
NH ₄ Ac 20 mmol L ⁻¹ pH 4,0-ACN (80:20)	2,6	1,07	0,63	2,1	1,14	1,03	1,7	1,11	0,68

Condições cromatográficas: vazão: 1 mL min⁻¹; comprimento de onda: 343 nm; NH₄Ac, acetato de amônio; MeOH, metanol; EtOH, etanol; IPA, isopropanol; ACN, acetonitrila; k_1 : fator de retenção do primeiro enantiômero eluído.

Assim como na cromatografia em fase reversa convencional, a retenção dos analitos foi dependente da porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, como mostrado na Figura 10. O uso de fases móveis com maior força de eluição (mais apolares) resultou em tempos de retenção menores e melhor resolução dos enantiômeros.

Figura 10. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição com diferentes porcentagens de solvente orgânico. Condições cromatográficas: solução-tampão acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ pH 4,0; vazão: 1 mL min⁻¹.

Da mesma forma, o emprego de soluções-tampão com diferentes valores de pH teve efeitos significativos na retenção e resolução dos analitos. Verifica-se que a fase móvel contendo a solução-tampão de maior valor de pH ofereceu maior separação de CQ e metabólitos com tempos de retenção maiores, conforme mostra a Figura 11. A estabilidade do complexo analito-seletor quiral é dependente da carga da molécula. De acordo com o fabricante da coluna, analitos de caráter básico apresentam melhor separação em baixos valores de pH. Logo, é recomendada a avaliação deste efeito em pequenas variações no pH da solução-tampão. Vale ressaltar que foram testados outros valores de pH (> 5) sem sucesso devido a enorme retenção dos analitos. Além disso, deve-se levar em consideração o intervalo de pH no qual é recomendado o uso da coluna (3,5 - 7,0).

Figura 11. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição com diferentes valores de pH da solução-tampão. Condições cromatográficas: solução-tampão acetato de amônio 20 mmol L⁻¹-metanol (70:30, v/v); vazão: 1 mL min⁻¹.

A melhor separação dos enantiômeros de CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V em modo reverso é ilustrada na Figura 12. Mesmo realizando várias modificações, não foi possível discriminar fármaco e metabólitos necessitando então da detecção por MS, a qual oferece maior seletividade. Desta forma, foi selecionado o método de separação obtido no modo polar-orgânico para o prosseguimento dos estudos (Figura 9). Nestas condições, o (-)-enantiômero de CQ e metabólitos elui primeiro e, para evitar o entupimento do capilar do MS pelos aditivos presentes na fase móvel (HAc e DEA), foi necessária a adição pós-coluna de água.

Figura 12. Separação dos enantiômeros da CQ e metabólitos empregando a coluna Chirobiotic V no modo reverso de eluição. Condições cromatográficas: solução-tampão acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ pH 4,0-metanol (50:50, v/v); vazão: 1 mL min⁻¹; detecção UV em 343 nm.

3.4.2 Otimização da extração empregando LPME

A próxima etapa envolveu a otimização do procedimento de extração em plasma utilizando LPME em três fases. Logo, alguns parâmetros importantes foram avaliados: escolha do solvente orgânico, ajuste de pH da solução contendo a amostra, concentração de ácido na fase aceptora, adição de sais na solução contendo a amostra e tempo de extração.

3.4.2.1 Seleção do solvente orgânico

Geralmente, a escolha do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana de polipropileno é o primeiro parâmetro a ser avaliado. De maneira similar à LLE convencional, os analitos devem ter afinidade pelo solvente utilizado para obtenção de recuperações satisfatórias (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Portanto, solventes comumente empregados em procedimentos de LPME em três fases foram avaliados (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). De acordo com a Figura 13, embora o acetato de dodecila tenha oferecido melhor extração dos enantiômeros da CQ, o solvente foi incapaz de retirar os enantiômeros da BDCQ das amostras de plasma. Logo, decidiu-se pelo uso do *n*-octanol nos estudos posteriores visto que este solvente permitiu a extração de todos os analitos.

Figura 13. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: adição de 100 μL de NaOH 5 mol L^{-1} na fase doadora; fase aceptora: ácido trifluoroacético 0,2 mol L^{-1} ; adição de sais na fase doadora: NaCl 10% (m/v); tempo de extração: 45 min; velocidade de agitação: 1200 rpm; concentração de cada enantiômero de CQ e metabólitos: 312 ng mL^{-1} ; análises em triplicata.

3.4.2.2 Ajuste do pH da amostra

O próximo parâmetro analisado foi a seleção do pH da amostra. Como CQ e metabólitos apresentam características básicas, a adição de NaOH na amostra foi realizada para manter o meio alcalino e os analitos na forma neutra, passíveis então de extração pelo procedimento de LPME em três fases (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Como mostrado na Figura 14, verifica-se diminuição da recuperação dos analitos com o aumento da concentração das soluções de NaOH utilizadas. Acredita-se que, de certa forma, a precipitação protéica em valores de pH mais elevados possa estar prejudicando a difusão dos analitos para a fase extratora. Portanto, optou-se por adicionar 100 μL de solução de NaOH 1 mol L^{-1} nos experimentos seguintes.

Figura 14. Ajuste do pH da amostra. Condições de extração: solvente orgânico: *n*-octanol; fase aceptora: ácido trifluoroacético 0,2 mol L⁻¹; adição de sais na fase doadora: NaCl 10% (m/v); tempo de extração: 45 min; velocidade de agitação: 1200 rpm; concentração de cada enantiômero de CQ e metabólitos: 312 ng mL⁻¹; análises em triplicata.

3.4.2.3 Seleção da fase aceptora

Na extração de analitos básicos por LPME em três fases, a fase aceptora deve estar na faixa ácida para manter os analitos na forma ionizada e impedir o retorno dos mesmos para a fase orgânica (PEDERSEN-BJERGAARD; HO; RASMUSSEN, 2002). Decidiu-se utilizar o TFA, um ácido orgânico forte, em diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,5 e 1 mol L⁻¹) para este propósito. Conforme mostra a Figura 15, a menor concentração de TFA utilizada forneceu maior recuperação dos enantiômeros de CQ e metabólitos e foi selecionado para os próximos ensaios. Para evitar problemas de separação e detecção dos analitos, o extrato foi seco antes da injeção no sistema cromatográfico.

Figura 15. Seleção da fase aceptora (ácido trifluoroacético – TFA). Condições de extração: solvente orgânico: *n*-octanol; adição de 100 μ L de NaOH 1 mol L⁻¹ na fase doadora; adição de sais na fase doadora: NaCl 10% (m/v); tempo de extração: 45 min; velocidade de agitação: 1200 rpm; concentração de cada enantiômero de CQ e metabólitos: 312 ng mL⁻¹; análises em triplicata.

3.4.2.4 Adição de sais na amostra

A adição de sais na amostra pode ser benéfica na extração de alguns analitos, principalmente os mais polares, devido ao efeito denominado *salting-out* (FLANAGAN et al, 2006). Portanto, a adição de NaCl na amostra foi avaliada em diferentes concentrações (5, 10 e 15%, m/v). Porém, conforme observado na Figura 16, não houve aumento na extração dos enantiômeros de CQ e metabólitos com o uso de NaCl na fase doadora. De forma interessante, o resultado obtido neste estudo foi diferente do relatado por De Oliveira et al. (2007), os quais observaram aumento na eficiência da extração de HCQ e metabólitos de amostras de urina utilizando esta técnica. Supõe-se que, devido a maior viscosidade do plasma em relação à urina, a presença de sais na amostra tenha prejudicado a passagem dos analitos para a fase extratora presente na membrana. Logo, decidiu-se realizar as extrações posteriores sem a adição de sais.

Figura 16. Adição de sais na amostra. Condições de extração: solvente orgânico: *n*-octanol; adição de 100 μL de NaOH 1 mol L^{-1} na fase doadora; fase aceptora: ácido trifluoroacético 0,1 mol L^{-1} ; tempo de extração: 45 min; velocidade de agitação: 1200 rpm; concentração de cada enantiômero de CQ e metabólitos: 312 ng mL^{-1} ; análises em triplicata.

3.4.2.5 Tempo de extração

O último parâmetro estudado foi o tempo de extração. De acordo com Shen e Lee (2002), LPME é um procedimento baseado no equilíbrio de extração. Por conseguinte, o sistema necessita de um determinado período para atingi-lo, o qual dependerá das características do analito e da amostra, dentre outras. Alcançado o equilíbrio de extração, ganhos significativos de extração não são observados. O tempo de extração foi avaliado no intervalo de 15-60 min. Conforme mostra a Figura 17, o tempo de extração em equilíbrio foi alcançado em torno de 45 min.

Figura 17. Tempo de extração. Condições de extração: solvente orgânico: *n*-octanol; adição de 100 μL de NaOH 1 mol L^{-1} na fase doadora; fase aceptora: ácido trifluoroacético 0,1 mol L^{-1} ; velocidade de agitação: 1200 rpm; concentração de cada enantiômero de CQ e metabólitos: 312 ng mL^{-1} ; análises em triplicata.

3.4.2.6 Procedimento de extração otimizado

Após a verificação e definição destes parâmetros importantes, as condições otimizadas no preparo das amostras são mostradas na Tabela 6:

Tabela 6. Procedimentos otimizados para LPME.

<i>Fase</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Variável</i>
Matriz plasmática (1 mL)	Ajuste de pH	Adição de 100 μL de NaOH 1 mol L^{-1}
	Adição de NaCl	Não
Solvente orgânico	Tipo	<i>n</i> -octanol
Fase aceptora	Tipo	Ácido trifluoroacético 0,1 mol L^{-1}

Embora o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio tenha ocorrido em torno de 45 min, optou-se por utilizar 30 min para cada extração no intuito de possibilitar alta capacidade de processamento das amostras sem nenhum prejuízo na detectabilidade do método. Buscando este mesmo objetivo, uma nova configuração de LPME foi desenvolvida e empregada (Figura 7), a qual facilitou a aplicação da técnica em um número maior de

amostras (36 ao mesmo tempo empregando o agitador descrito no item 3.3.2.2).

3.4.3 Validação do método desenvolvido

A validação de métodos bioanalíticos configura-se como condição fundamental para obtenção de resultados confiáveis em amostras reais. Com isso, alguns parâmetros essenciais (linearidade, recuperação, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade) foram avaliados previamente a aplicação do método na análise de amostras de plasma de ratos.

Para correção de eventuais erros durante o processamento das amostras, optou-se por utilizar a padronização interna. Desta forma, o fármaco HCQ foi adicionado às amostras e o primeiro pico foi selecionado para quantificação das mesmas. A escolha deste composto foi devido à semelhança estrutural com CQ e metabólitos, a qual rendeu perfil cromatográfico e de extração semelhante aos dos analitos de estudo (a recuperação absoluta de HCQ foi aproximadamente de 50%).

3.4.3.1 Linearidade

Para a construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método, foram empregadas amostras de plasma fortificadas com soluções-padrão de CQ e metabólitos, no intervalo de 5 a 500 ng de cada enantiômero por mL de plasma. O tratamento estatístico das curvas analíticas envolveu a determinação da equação de regressão linear pelo método dos mínimos

quadrados e do coeficiente de determinação (r^2), bem como ANOVA da equação de regressão pelo teste do ajuste do modelo linear (*lack-of-fit*) para confirmação da linearidade.

Os dados apresentados na Tabela 7 evidenciam linearidade satisfatória no intervalo de concentrações plasmáticas selecionado, com coeficientes de determinação (r^2) > 0,99 para todos os analitos. A análise de variância dos dados comprovou a significância das equações de regressão, não havendo falta de ajuste do modelo linear ($p > 0,05$).

Tabela 7. Linearidade do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.

Analito	Equação linear	r^2	ANOVA <i>lack-of-fit</i>	
			F	p
(-)-(R)-CQ	$y = 0.0024x - 0.003$	0,9978	1,50	0,26
(+)-(S)-CQ	$y = 0.002x + 0.0049$	0,9956	1,85	0,17
(-)-(R)-DCQ	$y = 0.0033x + 0.0058$	0,9956	0,24	0,93
(+)-(S)-DCQ	$y = 0.0027x - 0.0036$	0,9976	2,50	0,10
(-)-(R)-BDCQ	$y = 0.0026x - 0.0168$	0,9975	2,32	0,09
(+)-(S)-BDCQ	$y = 0.0021x - 0.0082$	0,9965	0,61	0,69

r^2 , coeficiente de determinação.

3.4.3.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação escolhido foi o menor ponto da curva analítica, conforme determinado na literatura vigente (FDA, 2001; ANVISA, 2003). O método desenvolvido permitiu a determinação de até 5 ng de cada enantiômero de CQ e metabólitos por mL de plasma, o qual foi obtido com valores de desvio-padrão relativo e erros relativos inferiores a 20% (Tabela 8).

Tabela 8. Limite de quantificação do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.

Analito	Concentração obtida (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Erro relativo (%)
(-)-(R)-CQ	4,3	14,0	-13,5
(+)-(S)-CQ	4,0	14,3	-19,6
(-)-(R)-DCQ	4,7	12,8	-5,4
(+)-(S)-DCQ	4,6	4,2	-7,7
(-)-(R)-BDCQ	4,4	8,6	-11,7
(+)-(S)-BDCQ	4,7	7,7	-6,6

análises em quintuplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

3.4.3.3 Recuperação

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

Tabela 9. Recuperações médias do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.

Analito	Recuperação (%)	RSD (%)
(-)-(R)-CQ	28,5	13,5
(+)-(S)-CQ	29,7	8,1
(-)-(R)-DCQ	48,7	12,6
(+)-(S)-DCQ	47,6	11,7
(-)-(R)-BDCQ	66,5	14,0
(+)-(S)-BDCQ	65,2	11,4

análises em triplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

Os valores de recuperação do método otimizado mantiveram-se entre 28 e 66% (Tabela 9). Os enantiômeros da BDCQ, metabólito mais polar e portanto com maior afinidade pela fase aceptora aquosa, apresentaram maiores valores

de extração. Os valores de desvio-padrão relativo não superiores a 15% indicam boa repetibilidade do procedimento de extração.

3.4.3.4 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método desenvolvido, foram empregadas amostras de plasma fortificadas em três níveis de concentração plasmática (alta, média e baixa). A precisão e exatidão interensaios foram avaliadas durante três dias consecutivos em quintuplicata e a precisão e exatidão intraensaio foram feitas pela análise de cinco amostras no mesmo dia.

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão. Através da análise dos valores observa-se que o método proposto apresenta alta precisão e exatidão, visto que os valores de desvio-padrão relativo e erros relativos mantiveram-se abaixo de 15%, aceitáveis para a análise de fármacos em fluidos biológicos.

3.4.3.5 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade dos enantiômeros da CQ e metabólitos foi avaliado nas amostras mantidas à temperatura ambiente durante 12 h e após ciclos de congelamento e descongelamento, conforme recomendado na literatura vigente (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

De acordo com a Tabela 11, pode-se verificar que os enantiômeros da CQ foram estáveis quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente ou expostos a ciclos de congelamento e descongelamento (-20 a 25 °C) com valores de $p > 0,05$.

Tabela 10. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.

	Intraensaio ^a			Interensaios ^b		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%) ^c	E ^d (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	E (%)
15 ng mL ⁻¹						
(-)-(R)-CQ	13,8	5,7	-7,7	13,9	9,9	-7,3
(+)-(S)-CQ	14,4	9,8	-4,3	14,7	12,1	-2,0
(-)-(R)-DCQ	16,0	2,6	6,6	16,5	5,8	10,3
(+)-(S)-DCQ	16,9	6,2	12,5	16,4	7,4	9,0
(-)-(R)-BDCQ	15,4	9,3	3,0	14,6	10,6	-2,9
(+)-(S)-BDCQ	15,0	5,4	0,2	14,4	10,1	-3,9
200 ng mL ⁻¹						
(-)-(R)-CQ	182,4	5,0	-8,8	181,0	8,0	-9,5
(+)-(S)-CQ	193,1	10,8	-3,4	182,4	11,1	-8,8
(-)-(R)-DCQ	186,7	3,9	-6,6	195,5	7,0	-2,3
(+)-(S)-DCQ	177,4	3,4	-11,3	186,9	8,8	-6,5
(-)-(R)-BDCQ	207,7	12,4	3,9	197,1	11,0	-1,5
(+)-(S)-BDCQ	193,8	6,7	-3,1	197,9	8,8	-1,0
450 ng mL ⁻¹						
(-)-(R)-CQ	412,8	11,7	-8,3	426,8	13,1	-5,2
(+)-(S)-CQ	412,3	9,2	-8,4	434,1	9,9	-3,5
(-)-(R)-DCQ	420,0	8,7	-6,7	446,3	7,8	-0,8
(+)-(S)-DCQ	429,6	10,0	-4,5	434,2	7,5	-3,5
(-)-(R)-BDCQ	490,1	7,1	8,9	483,6	7,9	7,5
(+)-(S)-BDCQ	477,4	3,0	6,1	464,2	8,0	3,2

^aquintuplicata para cada concentração; ^banálises em três dias consecutivos; ^cdesvio-padrão relativo; ^derro relativo.

Tabela 11 Estudo de estabilidade^a (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de CQ e metabólitos em plasma.

Analito	Ciclos		Armazenamento	
	15 ng mL ⁻¹	450 ng mL ⁻¹	15 ng mL ⁻¹	450 ng mL ⁻¹
(-)-(R)-CQ	0,50	0,09	0,48	0,08
(+)-(S)-CQ	0,89	0,09	0,59	0,08
(-)-(R)-DCQ	0,27	0,14	0,07	0,10
(+)-(S)-DCQ	0,63	0,13	0,39	0,08
(-)-(R)-BDCQ	0,85	0,21	0,28	0,28
(+)-(S)-BDCQ	0,51	0,36	0,17	0,21

^aexpresso pelo valor de *p*; análises em triplicata.

Embora não tenha sido avaliada a interferência de outros fármacos, o método foi seletivo frente aos componentes endógenos de plasma humano e de ratos, visto a ausência de interferentes no branco destas matrizes conforme evidenciado na Figura 18. A Figura seguinte mostra um cromatograma típico obtido na análise de plasma humano fortificado com os analitos e o padrão interno (Figura 19).

Figura 18. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano (esquerda) e de ratos (direita) segundo o método desenvolvido.

Figura 19. Cromatogramas referentes à análise de amostra de plasma fortificado com os enantiômeros de CQ e metabólitos na concentração de 100 ng mL^{-1} e enantiômeros da HCQ (padrão interno) na concentração de $312,5 \text{ ng mL}^{-1}$ segundo o método desenvolvido. Picos: 1, (-)-(R)-HCQ; 2, (+)-(S)-HCQ; 3, (-)-(R)-CQ; 4, (+)-(S)-CQ; 5, (-)-(R)-DCQ; 6, (+)-(S)-DCQ; 7, (-)-(R)-BDCQ; 8, (+)-(S)-BDCQ.

3.4.4 Aplicação do método desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo piloto de disposição cinética em ratos. Para tanto, difosfato de cloroquina racêmico foi administrado por via oral (gavagem) em solução aquosa, na dose única de 20 mg/kg.

A disposição cinética da CQ no plasma de ratos sugere enantiosseletividade com maiores concentrações de (+)-(S)-CQ (Figura 20). Por outro lado, foram obtidas maiores concentrações de (-)-(R)-DCQ. De acordo com Ducharme e Farinotti (1996), este perfil pode ser explicado pelo metabolismo preferencial, originando (-)-(R)-DCQ a partir de (-)-(R)-CQ (o carbono quiral não é afetado pela reação de biotransformação) ou excreção renal seletiva vista em ratos. Além do mais, o resultado está de acordo com o relatado por Augustijns et al. (1999) em um estudo de metabolismo utilizando microsossomos hepáticos de ratos.

Figura 20. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) *versus* tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos, após dose oral única de cloroquina racêmica (20 mg/kg; $n = 3$).

De maneira interessante, a disposição cinética em ratos foi inversa à encontrada em humanos (OFORI-ADJEI et al., 1986; AUGUSTIJNS;

VERBEKE, 1993) e coelhos (AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1992), em que maiores concentrações de (-)-(*R*)-CQ e (+)-(*S*)-DCQ são observadas. Logo, verifica-se diferenças entre as espécies com relação à farmacocinética enantiosseletiva da CQ e metabólito. Neste estudo, não foi verificada a formação dos enantiômeros da BDCQ, os quais são quantificados em estudos de dose múltipla (AUGUSTIJNS; VERBEKE, 1993).

3.4.5 Avaliação do método desenvolvido

O método desenvolvido para a análise enantiosseletiva de CQ e metabólitos em plasma apresentou parâmetros de confiança adequados para métodos bioanalíticos, diferentemente dos outros métodos descritos na literatura para estes analitos, os quais não foram validados previamente à aplicação de amostras reais (Tabela 1). A utilização da coluna Chirobiotic V no modo polar-orgânico forneceu a separação dos analitos em um tempo adequado de análise (12 min). O procedimento de LPME em três fases permitiu a extração de todos os analitos e, embora valores de recuperação intermediários tenham sido obtidos (28-66%), o emprego de LC-MS-MS no modo MRM como técnica analítica possibilitou determinar estes analitos em baixas concentrações nas amostras de plasma (5 ng mL^{-1}) sem a necessidade do isolamento prévio de fármaco e metabólitos.

4 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM PLASMA

4.1 Introdução

A mefloquina (MQ) foi lançada com o intuito de combater as cepas de *P. falciparum* resistentes à CQ, sendo utilizada tanto na profilaxia quanto no tratamento da malária. O fármaco apresenta dois centros quirais na estrutura (Figura 21). Porém, a MQ é administrada na forma de racemato dos isômeros *eritro* (BROCKS; MEHVAR, 2003).

Figura 21. Estruturas da mefloquina (esquerda) e do principal metabólito carboximefloquina (direita).

Há controvérsias acerca da diferença de atividade dos enantiômeros da MQ. Em alguns estudos *in vitro*, os dois enantiômeros foram igualmente ativos contra cepas de *P. yoelli* (PETERS et al., 1995) e de *P. falciparum* (BASCO et al., 1992). Em outro estudo, (+)-(RS)-MQ foi mais ativo contra diferentes cepas de *P. falciparum* (KARLE et al., 1993). Dentre os eventos adversos relacionados ao uso do fármaco, destacam-se os efeitos neuropsiquiátricos, porém o papel da enantiosseletividade neste processo é desconhecido (BROCKS; MEHVAR, 2003). Pham et al. (1999) verificaram maiores concentrações cerebrais de (-)-(SR)-MQ em análise *postmortem* de pacientes

vitimados por malária cerebral. A penetração dos enantiômeros da MQ no cérebro de ratos também foi seletiva na mesma maneira vista em humanos. Por outro lado, não foi observada a presença do metabólito CMQ no tecido cerebral (BAUDRY et al., 1997). A interação enantiosseletiva dos enantiômeros da MQ com a glicoproteína-P (proteína transportadora de membranas celulares), presente na barreira hematoencefálica, pode explicar tal comportamento (PHAM et al., 2000).

O fármaco apresenta ampla distribuição, sendo altamente ligado às proteínas plasmáticas (~98%). A MQ possui lenta meia-vida de eliminação (aproximadamente 20 dias). Nos seres humanos, a excreção é principalmente fecal; somente pequenas quantidades são eliminadas na urina (KARBWANG; WHITE, 1990). De acordo com Hellgren et al. (1997), (-)-(SR)-MQ sofre recirculação entero-hepática. Em voluntários sadios ocidentais e orientais, em todos os parâmetros farmacocinéticos observados (com exceção de t_{max}), os valores de (-)-(SR)-MQ foram maiores que os do antípoda (MARTIN et al., 1994; GIMENEZ et al., 1994). Tais resultados foram corroborados por estudos em crianças e pacientes sob tratamento crônico (BOURAHILA et al., 1996; HELLGREN et al., 1997). No entanto, resultados contrários foram observados em ratos, obtendo-se valores mais elevados para (+)-(RS)-MQ, indicando cinética enantiosseletiva diferencial entre as espécies (BAUDRY et al., 1997; MAGALHÃES; BONATO, 2008).

O fármaco sofre metabolização hepática pelo complexo enzimático do citocromo P450, principalmente a isoforma 3A4, resultando na formação de metabólitos hidroxilados e carboxilados. O principal metabólito é a carboximefloquina (CMQ) que, diferentemente do composto original, não

apresenta centros quirais (Figura 21). Estudos *in vitro* demonstraram ausência de atividade antimalárica da CMQ, porém a determinação plasmática do metabólito é importante para o acompanhamento da terapêutica (HÅKANSON; LANDBERG-LINDGREN; BJÖRKMAN, 1990; BANCHANG; KARBWANG; BACK, 1992; BASCO et al., 1991).

A maioria dos métodos disponíveis para a determinação enantiosseletiva da MQ utiliza HPLC como técnica analítica (Tabela 1). Alguns métodos requerem a prévia separação do fármaco em um sistema aquiral e posterior resolução dos enantiômeros utilizando colunas contendo CSPs (GIMENEZ et al., 1990; 1993). Esses métodos apresentam certos inconvenientes como o difícil manuseio e a necessidade de instrumentação específica. Desta forma, métodos que apresentam a separação direta em colunas quirais foram desenvolvidos (QIU; KITAMURA; GUILLORY, 1990; WALLÉN et al., 1994; MAGALHÃES; BONATO, 2008). Métodos indiretos, os quais necessitam da derivatização do analito, também são descritos na literatura (BERGQVIST et al., 1993; 1994; SOURI; FARSAM; JAMALI, 1997).

Mais recentemente, métodos baseados em CE foram desenvolvidos para análise enantiosseletiva da MQ. Tais metodologias têm como característica comum o emprego de CDs como seletores quirais (HEUERMANN; BLASCHKE, 1993; STALCUP; AGYEL, 1994; KOPPENHOEFER et al., 1995; 1997; 1998; FANALI; CAMERA, 1996; CHANKVETADZE; BURJANADZE; BLASCHKE, 2003). No entanto, nenhum destes métodos apresenta aplicação em fluidos biológicos.

Os métodos descritos acima não propiciam a análise simultânea dos enantiômeros da MQ e do principal metabólito CMQ. Enquanto MQ é um

fármaco de caráter básico, CMQ apresenta caráter ácido, tornando difícil a determinação simultânea pelas características díspares destes analitos (GREEN et al., 1999).

4.2 Objetivo específico

Desenvolver e validar método de análise enantiosseletiva da MQ e do metabólito aquiral CMQ em plasma empregando LPME com aplicação em um estudo piloto de disposição cinética em ratos.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Materiais

4.3.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes empregados no preparo das soluções-tampão (fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico dihidratado, fosfato de sódio tribásico e acetato de amônio) foram grau p.a., obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico (37%) foram adquiridos da Spectrum Chemical Corp. (Gardena, EUA) e J. T. Baker (Phillipsburg, EUA), respectivamente. Ácido perclórico (70%) foi obtido da Nuclear (São Paulo, Brasil). Hidróxido de tetrabutylamônio (98%) foi adquirido da Fluka (Buchs, Suíça). A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema Milli-Q-Plus® (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (hexano – 65%, metanol, etanol e acetonitrila) foram grau cromatográfico, obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e EM Science (Gibbstown, EUA). Ácido

trifluoroacético e dietilamina, empregados como aditivos na fase móvel, foram adquiridos da Fluka (Buchs, Suíça). O aditivo trifluoroacetato de amônio (98%) foi obtido da Acros Organics (New Jersey, EUA).

Os seletores quirais empregados em CE foram: β -ciclodextrina hidroxipropilada (HP- β -CD), obtida da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, EUA), β -ciclodextrina carboximetilada (CM- β -CD) e β -ciclodextrina heptakis (2,6-di-metil-O-metil)(DM- β -CD), provenientes da Fluka (Buchs, Suíça), β -ciclodextrina sulfatada (SU- β -CD) e β -ciclodextrina sulfobutil éter (SBE- β -CD), obtidas da Supelco (Bellefonte, EUA).

As soluções de eletrólitos, soluções de eletrólitos adicionadas de seletor quiral e soluções de hidróxido de sódio foram filtradas em filtro Millex-HA com poros de 0,45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, EUA), desgaseificadas no ultrassom durante 5 minutos e imediatamente empregadas nas análises.

Os solventes utilizados na otimização do método empregando LPME foram éter diexílico (Alfa Aesar – Johnson Matthey Company, Ward Hill, EUA), acetato de dodecila e *n*-octanol, ambos provenientes da Sigma (St. Louis, EUA), todos de grau cromatográfico ou analítico. O solvente tolueno utilizado no método empregando pares iônicos foi obtido da Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).

4.3.1.2 Soluções-padrão

Os padrões de MQ e CMQ utilizados na preparação das soluções-padrão foram gentilmente cedidos por Novartis (Basel, Suíça). Em primeiro lugar, foram preparadas soluções de MQ e CMQ em metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

¹. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de uso por diluição em

metanol na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram empregadas para avaliação das colunas cromatográficas e otimização do método de extração. Para os testes envolvendo CE, foram preparadas soluções de uso dos analitos em metanol na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Da mesma forma, soluções-padrão nas concentrações de 4, 8, 40, 80 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MQ e 2, 4, 20, 40 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CMQ foram preparadas para os experimentos de validação do método. Para obtenção das amostras-controle, foram preparadas soluções nas concentrações de 6, 60 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MQ e 3, 60 e 100 de $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CMQ. Todas as soluções foram estocadas a -20°C e protegidas da luz durante todo o processo.

4.3.1.3 Amostras de plasma

No desenvolvimento e validação do método, foram utilizadas amostras de plasma humano livres dos analitos, obtidas junto ao Hemocentro do Hospital São Francisco, armazenadas a -20°C até o momento da análise. As amostras em uso foram inicialmente descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas durante 10 min a $2000 g$ para a remoção de partículas suspensas.

4.3.1.4 Animais

Os animais utilizados neste experimento foram da mesma espécie e procedência e tiveram o mesmo tratamento descrito no item 3.3.1.4.

4.3.2 Equipamentos

4.3.2.1 Sistema eletroforético

As análises foram realizadas em um equipamento CE proveniente da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), modelo 61600, constituído por analisador, amostrador automático, detector UV por arranjo de diodos e sistema de aquisição de dados com o software ChemStation. Foi empregado um capilar de sílica fundida recoberto externamente por uma camada de poliimida, obtido da MicroSolv Technology Corporation (Eatontown, EUA). O diâmetro interno do capilar usado foi de 50 µm e comprimento total de 48 cm (início dos experimentos). Uma janela de detecção de aproximadamente 0,5 cm foi feita pela queima da camada de poliimida a partir de 8 cm da extremidade do capilar. Após a queima promoveu-se a limpeza da região com auxílio de algodão e metanol.

4.3.2.2 Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico foi constituído por um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba modelo LC10AT VP, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 µL, um detector por absorbância no UV-Vis modelo SPD-A VP operando em 285 nm e um sistema controlador modelo SCL-10A VP. Para o controle do sistema e obtenção dos dados, utilizou-se o programa Shimadzu LC Solution (versão 1.22 SP1).

4.3.2.3 Colunas cromatográficas quirais e de guarda

Para a escolha de uma coluna apropriada e eficiente para a separação dos analitos, foram avaliadas colunas cromatográficas quirais baseadas em derivados de antibióticos (Chirobiotic T) e polissacarídeos (Chiralcel OD-H), ambas com 150 x 4,6 mm e partículas de 5 µm, provenientes da Astec Inc. (Whippany, EUA) e Chiral Technologies Inc. (Exton, EUA), respectivamente. Para análise de amostras de plasma, utilizou-se uma coluna de guarda C₈ LiChrospher, com 4 x 4 mm e partículas de 5 µm, proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3.2.4 Equipamentos e materiais utilizados em LPME

Durante a etapa de preparação das amostras empregando a LPME, foram utilizados um agitador de tubos AP56 (Phoenix, Araraquara, Brasil) e um agitador Vibrax VXR (IKA, Staufen, Alemanha). Outros materiais empregados na otimização do procedimento de LPME incluíram: frascos de vidro com capacidade para 4 mL, membranas capilares de polipropileno, modelo Accurel PP Q 3/2 (600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura da parede e 0,2 µm de tamanho dos poros - Membrana, Wuppertal, Alemanha) e uma microseringa com capacidade para 250 µL (modelo 1725 RN – Hamilton, Reno, EUA). Ponteiros de aplicação de eletroforese em gel (Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, EUA) juntamente com tampas *snap cap* de poliuretano (Agilent, Santa Clara, EUA) foram utilizadas como suporte das membranas.

4.3.2.5 Outros equipamentos

Na preparação das soluções-padrão e de eletrólitos foram utilizados uma balança analítica Ohaus Corp., modelo Adventurer (Pine Brook, EUA) e um aparelho de ultrassom Thornton, modelo UltraSonic Cleaner 1450 (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba, Brasil). Um agitador magnético modelo PC-210 e um pHmetro Orion modelo 420A+, obtidos da Corning Inc. (Corning, EUA) e Thermo Electron Corporation (Waltham, EUA), respectivamente, também foram empregados.

4.3.3 Métodos

4.3.3.1 Tratamento do capilar em CE

Antes da primeira análise, o capilar foi condicionado através de um programa de lavagem, conforme as recomendações do fabricante do equipamento CE, que constou das seguintes etapas:

1. Solução de NaOH 1 mol L⁻¹ a 30 °C durante 5 min;
2. Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ a 20 °C durante 10 min;
3. Água a 20 °C durante 10 min;
4. Solução de eletrólitos a 20 °C durante 1 min;

No final de cada dia, o capilar era lavado com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ a 20 °C seguido de água durante 10 min. Durante a noite, as duas extremidades do capilar permaneciam imersas em água.

4.3.3.2 Separação eletroforética da CMQ e dos enantiômeros da MQ

Vinte e cinco microlitros de solução-padrão de MQ e CMQ, nas concentrações de 200 µg mL⁻¹, foram transferidos para tubos cônicos âmbar e

o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. O resíduo foi dissolvido em 100 μL da solução utilizada para análise em CE, na ausência do seletor quiral, diluída dez vezes em água; os tubos foram agitados em *vortex* durante 30 s. Em seguida, o volume foi transferido para o frasco de injeção. A injeção das amostras foi feita sob pressão de 50 mbar durante 10 s e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 222 nm.

4.3.3.3 Avaliação das colunas cromatográficas quirais

Para a eficaz resolução dos analitos, fez-se necessária a avaliação das colunas cromatográficas expostas acima em três modos: normal, empregando-se um solvente orgânico apolar e um solvente orgânico polar juntamente com aditivos; polar orgânico, utilizando-se solventes orgânicos polares contendo aditivos; ou modo reverso, com fases móveis compostas por uma fase aquosa e um solvente orgânico polar. As fases móveis empregadas nos modos normal e polar orgânico foram preparadas pela simples mistura dos componentes com posterior homogeneização. As fases móveis empregadas no modo reverso foram previamente filtradas a vácuo através de uma membrana da Millipore (São Paulo, Brasil) com poros de 0,45 μm e previamente desgaseificadas no ultrassom por 5 min.

Para a avaliação das colunas cromatográficas, 25 μL das soluções-padrão dos analitos na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL da fase móvel e 50 μL foram cromatografados. As injeções foram realizadas somente após o condicionamento da coluna com a fase móvel e estabilização da linha de base.

No final da avaliação diária, procedeu-se a lavagem das colunas operando no modo normal com hexano:isopropanol (9:1, v/v) e no modo polar-orgânico com o solvente orgânico utilizado na fase móvel isento de aditivos. Já para as colunas avaliadas no modo reverso de eluição, realizou-se a lavagem com solvente orgânico e água, na mesma proporção da fase móvel.

Na avaliação das colunas cromatográficas quirais, alguns parâmetros cromatográficos, como fatores de retenção (k) e de separação (α), resolução (R_s) e número de pratos teóricos foram calculados de acordo com o método descrito na *United States Pharmacopeia* (USP).

4.3.3.4 Ordem de eluição dos enantiômeros

Após estabelecer as condições de separação, a ordem de eluição dos enantiômeros da MQ foi determinada conforme descrito no item 2.3.3.2. Os resíduos obtidos foram dissolvidos e analisados no método descrito por Qiu et al. (1992).

4.3.3.5 Microextração em fase líquida

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando-se 1 mL de plasma fortificado com 25 μ L de solução-padrão de cada analito. Fez-se diluição com água purificada para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma livres dos analitos, bem como alíquotas de água purificada também foram processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Para cada extração, um dispositivo de extração composto de uma seção de membrana capilar de polipropileno de 15 cm de comprimento fixada nas extremidades com o auxílio de ponteiros e uma tampa tipo *snap cap* (Figura 7) foi imersa durante 5 s no solvente orgânico para sua deposição nos poros da membrana. Em seguida, o excesso de solvente foi retirado em banho ultrassônico durante 10 s. Após a impregnação, cerca de 50 μL de fase aceptora ácida foram introduzidos no interior da membrana capilar utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar então foi imersa na fase doadora (matriz contendo os analitos) e a extração foi iniciada sob agitação (1750 rpm). Após o tempo necessário de extração, a fase aceptora foi retirada da membrana usando uma microseringa e transferida para um tubo de ensaio âmbar. Em seguida, a amostra foi acidificada e outro processo de extração tinha início nas mesmas condições, com exceção do emprego de uma fase aceptora alcalina. Finalmente, o extratos resultantes das duas etapas foram colocados no mesmo frasco e evaporados à secura sob fluxo de ar comprimido, sendo então dissolvidos em 70 μL de fase móvel e 50 μL injetados no sistema cromatográfico. Para evitar problemas de contaminação, cada dispositivo foi utilizado uma única vez e a microseringa empregada para injeção foi lavada com a própria fase aceptora após cada amostra.

Na avaliação do procedimento de extração empregando LPME em três fases, avaliou-se a influência do tipo de solvente orgânico e do tipo e concentração de fase aceptora alcalina na fase doadora.

4.3.3.6 Validação do método desenvolvido

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

A validação do método foi realizada de maneira semelhante a descrita no item 3.3.3.4. No entanto, o procedimento realizado contemplou o intervalo de concentrações alcançados no plasma após a administração em doses terapêuticas do fármaco em humanos (Tabela 12). Além disso, as áreas dos picos foram utilizadas para os cálculos dos diferentes parâmetros.

Tabela 12. Concentrações avaliadas na validação do método de análise dos enantiômeros da MQ e CMQ em plasma.

Parâmetro	Concentrações avaliadas (ng mL^{-1})							
	Enantiômeros da MQ				CMQ			
Linearidade	50,	100,	500,	1000,	50,	100,	500,	1000,
	1500				3000			
Limite de quantificação	50				50			
Recuperação	150, 750, 1250				150, 1500, 2500			
Precisão e exatidão	150, 750, 1250				150, 1500, 2500			
Estabilidade	150, 1250				150, 2500			

4.3.3.7 Aplicação do método desenvolvido

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

As amostras de sangue (6 mL) foram colhidas por decaptação nos tempos 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h após a administração ($n = 3$ para cada tempo de coleta), utilizando-se heparina (Liquemine 25.000 UI, Roche) como anticoagulante. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 g , 15 min) foram armazenados a -20 °C e sob proteção da luz até o momento da análise.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela CEUA do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Separação eletroforética da CMQ e dos enantiômeros da MQ

Para obter a separação apropriada dos analitos em CE, alguns parâmetros importantes foram avaliados: pH e concentração da solução de eletrólitos, tipo e concentração de seletor quiral, voltagem e temperatura aplicadas e comprimento do capilar.

4.4.1.1 pH da solução de eletrólitos

O pH da solução de eletrólitos é considerado o principal parâmetro na separação de analitos de caráter ácido-base, pois influencia tanto o fluxo eletroosmótico (EOF) quanto a mobilidade eletroforética inerente da molécula em questão (ALTRIA, 1996). Logo, a avaliação do pH da solução de eletrólitos foi feita usando soluções-tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ em meio ácido (pH 5,0), neutro (pH 7,0) e básico (pH 9,0). A HP- β -CD, uma CD neutra, foi escolhida para este estudo inicial, por apresentar amplo emprego em

separações quirais descritas na literatura além de permanecer com as mesmas características em qualquer valor de pH (GÜBITZ; SCHIMD, 1997).

Figura 22. Efeito da variação do pH da solução de eletrólitos. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹; seletor quiral: hidroxipropil-β-ciclodextrina 50 mmol L⁻¹; voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C; α: fator de separação dos enantiômeros da MQ.

Na faixa ácida de pH, o EOF é baixo devido aos grupos silanóis presentes no interior do capilar estarem preferencialmente na forma não-ionizada (ALTRIA, 1996). Nestas condições, os enantiômeros da MQ (analito de caráter básico) estão ionizados alcançando o detector rapidamente, conforme observado na Figura 22. Por outro lado, não foi observada a migração da CMQ (analito de caráter ácido) em um tempo de análise de 40 min. Em meio ácido, a CMQ encontra-se na forma neutra, necessitando do EOF para mobilização no sistema. O próximo valor de pH avaliado foi o pH 7,0 (meio neutro). Nestas condições, o EOF é suficientemente forte para arrastar moléculas neutras em direção ao cátodo (TAVARES, 1996). Conforme previsto, ocorreu a migração dos analitos em tempos de análise satisfatórios. O último valor de pH investigado foi o pH 9,0 (alcalino). Apesar da diminuição dos tempos de migração de todos os analitos observada nestas condições

provocada pelo aumento do EOF, houve prejuízo na resolução dos enantiômeros da MQ. Além disso, observou-se diminuição da solubilidade da MQ na solução empregada para preparação das amostras na faixa neutra e alcalina de pH. Portanto, o pH 6,0, o qual conferiu bons resultados, foi selecionado para os próximos experimentos.

4.4.1.2 Concentração da solução de eletrólitos

A concentração da solução de eletrólitos tem vários efeitos sobre a separação em CE (TAVARES, 1997). Altas concentrações podem gerar aquecimento do sistema devido ao efeito Joule e, conseqüentemente, perda na resolução (WÄTZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Por outro lado, o emprego de baixas concentrações pode propiciar a adsorção dos analitos na parede do capilar levando ao prejuízo no formato dos picos (TAVARES, 1997).

Figura 23. Efeito da variação da concentração da solução de eletrólitos. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato pH 6,0; seletor quiral: hidroxipropil-β-ciclodextrina 50 mmol L⁻¹; voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C; α: fator de separação dos enantiômeros da MQ.

A concentração da solução de eletrólitos foi avaliada no intervalo de 10 a 100 mmol L⁻¹. De acordo com a Figura 23, houve diminuição dos tempos de

migração de todos os analitos com o emprego de soluções menos concentradas. O EOF diminui com o aumento da concentração de eletrólitos (devido à diminuição do potencial zeta) ocasionando maiores tempos de migração (ALTRIA, 1996). Por outro lado, foi verificada perda na resolução dos enantiômeros da MQ. Logo, optou-se por utilizar a concentração intermediária de 50 mmol L⁻¹ nos próximos experimentos.

4.4.1.3 Tipo de seletor quiral

Dentre os seletos quirais utilizados em CE, as CDs e derivados destas têm papel destacado devido à diversidade existente, seletividade oferecida, facilidade no emprego e disponibilidade comercial (VESPALEC; BOČEK, 1999; FANALI, 2000).

As CDs são oligossacarídeos naturais obtidos a partir da degradação do amido (FANALI, 2000). Apresentam formato similar a de um cone truncado com uma cavidade relativamente hidrofóbica e parte externa hidrofílica devido à presença de grupos hidroxila (VERLEYSEN; SANDRA, 1998). A resolução dos enantiômeros ocorre devido à formação de complexos de inclusão com a cavidade e/ou pela interação com os grupos hidroxila presentes na superfície, substituídos ou não (VESPALEC; BOČEK, 1999).

As CDs podem ser neutras ou carregadas de forma positiva ou negativa (FANALI, 2000). Dentre as vantagens atribuídas as CDs carregadas, pode-se destacar: maior solubilidade em meio aquoso, maior possibilidade de separação (devido ao efeito contra-íon) e ocorrência de interações eletrostáticas (VERLEYSEN; SANDRA, 1998).

Deste forma, avaliamos CDs com diferentes características para escolha do seletor quiral: HP- β -CD e DM- β -CD (neutras) e CM- β -CD, SU- β -CD e SBE- β -CD (carregadas negativamente). A escolha das CDs de carga negativa deve-se à possibilidade de formação de pares iônicos (e consequente separação) com os enantiômeros da MQ, os quais estarão na forma ionizada na faixa ácida de pH.

Dentre as CDs testadas, somente SU- β -CD e SBE- β -CD não propiciaram a resolução dos enantiômeros da MQ. A melhor separação foi obtida utilizando a CM- β -CD, conforme mostra a Figura 24. A resolução dos enantiômeros da MQ com a CM- β -CD, a qual contém grupos carboxila na estrutura, fora mencionada anteriormente na literatura (FANALI; CAMERA, 1996; CHANKVETADZE; BURJANADZE; BLASCHKE, 2003). No valor de pH estudado (6,0), CM- β -CD estará carregada negativamente, movendo-se na posição contrária dos analitos e ocasionando melhor separação (VERLEYSEN; SANDRA, 1998).

Figura 24. Resolução dos enantiômeros da MQ utilizando carboximetil- β -ciclodextrina como seletor quiral. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C; detecção UV em 222 nm.

4.4.1.4 Concentração do seletor quiral

A concentração do seletor quiral pode influenciar decisivamente na resolução dos enantiômeros. De acordo com Wätzig et al. (1998), há uma concentração ideal para eficaz formação do complexo analito-seletor quiral, devendo ser avaliada a interação em várias concentrações. Portanto, foi avaliada a concentração de CM- β -CD no intervalo de 0,25 a 1% (m/v). Como o uso de maiores concentrações gerava correntes muito elevadas (acima de 100 μ A), a concentração máxima avaliada foi de 1% (m/v).

Figura 25. Seleção da concentração do seletor quiral. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; seletor quiral: carboximetil- β -ciclodextrina; voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C; α : fator de separação dos enantiômeros da MQ.

Conforme visto na Figura 25, a melhor separação dos analitos foi atingida utilizando a concentração de 0,5% (m/v). Além disso, foi verificado um leve aumento nos tempos de migração na maior concentração estudada. Segundo Rizzi (2001), o aumento no tempo de migração com maiores concentrações de CDs deve-se tanto à interação entre os analitos e o seletor quiral quanto ao ganho de viscosidade do sistema.

4.4.1.5 Voltagem aplicada

A voltagem aplicada no sistema eletroforético é um fator importante na otimização em CE pois atua de forma positiva no EOF e na mobilidade eletroforética (ALTRIA, 1996). Deste modo, foram avaliadas voltagens entre 15 a 25 kV. Procurou-se utilizar a máxima voltagem que gerasse correntes não maiores que 100 μ A (neste caso, 25 kV).

Figura 26. Seleção da voltagem aplicada. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; seletor quiral: carboximetil-β-ciclodextrina 0,5% (m/v); temperatura: 20 °C; α: fator de separação dos enantiômeros da MQ.

Conforme esperado, houve diminuição nos tempos de migração de todos os analitos, principalmente da CMQ, com o aumento da voltagem aplicada (Figura 26). Apesar de fornecer tempos de retenção menores, o uso de altas voltagens pode resultar em aquecimento excessivo e perda na resolução (WÄTZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Portanto, para obtenção de um método mais reprodutível, a voltagem aplicada foi fixada em 20 kV.

4.4.1.6 Temperatura aplicada

A temperatura do sistema eletroforético influencia a separação dos analitos de várias maneiras (FANALI, 2000). O EOF depende da viscosidade da solução e, portanto, é diretamente proporcional a temperatura (WÄTZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Além disso, tratando-se de separações quirais, afeta a cinética e a dinâmica da interação analito-seletor quiral (FANALI, 2000). Logo, foram avaliadas temperaturas entre 15 e 25 °C.

Figura 27. Seleção da temperatura aplicada. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 40 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; seletor quiral: carboximetil- β -ciclodextrina 0,5% (m/v); voltagem: 20 kV; α : fator de separação dos enantiômeros da MQ.

De acordo com a Figura 27, a mudança na temperatura do sistema teve efeito mínimo sobre a separação dos analitos. Desta forma, por questões de reprodutibilidade, a temperatura de 20 °C foi escolhida.

4.4.1.7 Tamanho do capilar

Geralmente, a principal abordagem para redução do tempo de migração é a diminuição do tamanho do capilar utilizado (WÄTZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Como a corrida analítica estava em torno de 16 min com um

capilar de 40 cm de comprimento efetivo (Figura 28A), optou-se por diminuir o tamanho do mesmo para obter tempos de migração menores. Conforme visto na Figura 28B, utilizando um capilar de 27 cm de comprimento efetivo, o tempo de corrida obtido foi de 10 min. Vale ressaltar que a diminuição do tamanho do capilar não afetou significativamente a resolução dos analitos.

Figura 28. Seleção do tamanho do capilar. A: 40 cm (enantiômeros da MQ – 4,2 e 4,6 min); CMQ – 16,4 min); B: 27 cm (enantiômeros da MQ – 2,8 e 3,0 min; CMQ – 9,3 min). Condições eletroforéticas: solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; seletor quiral: carboximetil- β -ciclodextrina 0,5% (m/v); voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C; detecção UV em 222 nm.

4.4.1.8 Solução da amostra

Uma estratégia interessante para o aumento da detectabilidade em CE é o emprego da técnica denominada empilhamento da amostra (*sample stacking*), a qual geralmente utiliza gradientes de força iônica entre a solução de eletrólitos (mais concentrada) e a solução da amostra (FRIEDBERG; HINSDALE; SHIHABI, 1997). Neste trabalho, avaliou-se a influência do pH da

solução utilizada na dissolução da amostra bem como o efeito na presença de acetonitrila (SHIHABI, 1998).

De acordo com a Figura 29, observou-se um aumento na área dos picos dos enantiômeros da MQ com o emprego de solução mais ácida (pH 3,0) e, principalmente, com o uso de acetonitrila na solução da amostra. O ganho de detectabilidade utilizando-se acetonitrila em CE já havia sido relatado anteriormente para outros antimaláricos, como CQ e proguanil (TAYLOR; TOASAKSIRI; REID, 1998). Não houve diferença na área do pico da CMQ entre as soluções avaliadas.

Figura 29. Seleção da solução da amostra. Condições eletroforéticas: comprimento efetivo do capilar: 27 cm; solução de eletrólitos: solução-tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; seletor quiral: carboximetil- β -ciclodextrina 0,5% (m/v); voltagem: 20 kV; temperatura: 20 °C.

Apesar de bastante promissora no início dos experimentos de extração, a separação obtida mostrou repetibilidade insatisfatória dos tempos de migração dos analitos, o que poderia prejudicar o desenvolvimento do método. Este motivo, juntamente com a possibilidade de melhor detectabilidade empregando HPLC, nos levou a investigar a resolução dos enantiômeros da MQ e CMQ utilizando colunas cromatográficas quirais.

4.4.2 Separação empregando colunas cromatográficas quirais

Em estudos prévios foi verificada a resolução dos analitos empregando a coluna baseada em polissacarídeo Chiralcel OD-H em modo normal (MAGALHÃES, 2006). A separação dos enantiômeros da MQ e CMQ foi possibilitada pelo emprego de TFA e DEA na fase móvel. Em cromatografia quiral utilizando colunas derivadas de polissacarídeos, estes aditivos são normalmente empregados para a separação de fármacos de caráter ácido (TFA) e de caráter básico (DEA), conferindo picos simétricos e com tempos de retenção adequados (TANG, 1996). No caso da MQ (fármaco fracamente básico) e CMQ (metabólito fracamente ácido), o emprego de ambos aditivos na fase móvel foi essencial para a obtenção da resolução desejada. Além disso, fez-se necessária a avaliação da razão destes aditivos para obtenção da adequada resolução dos analitos (Figura 30).

Visando obter um método com limites de quantificação adequados para aplicações em estudos de disposição cinética, optou-se por usar LC-MS como técnica analítica e, para evitar a incompatibilidade do MS com a fase móvel apolar, o efluente da coluna foi misturado com etanol-água (95:5, v/v) antes de ser inserido na fonte de ionização ESI. Embora o uso da fase móvel no modo normal com a estratégia de infusão pós-coluna tenha funcionado, a DEA presente na fase móvel suprimiu a ionização da MQ, o que impossibilitou o emprego desta separação em conjunto com o MS.

Figura 30. Separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição com os aditivos dietilamina (DEA) e ácido trifluoroacético (TFA). Condições cromatográficas: fase móvel: Hexano-etanol-DEA-TFA (95:5:0,1:0,05, v/v/v/v); vazão: 1 mL min⁻¹; detecção UV em 285 nm; picos: (+)-(RS)-MQ (4,0 min); CMQ (4,9 min); (-)-(SR)-MQ (6,7 min).

Uma alternativa buscada foi a utilização do reagente trifluoroacetato de amônio (TFANH₄) como aditivo nas separações utilizando a coluna Chiralcel OD-H em fase normal. Recentemente, o emprego deste aditivo em colunas baseadas em polissacarídeos no modo normal de eluição tem se mostrado muito promissor, principalmente pela ausência do “efeito memória” ocasionado pelo uso de DEA na fase móvel (HOLDER; CHEN; MADLINGER, 2005). Conforme visto na Figura 31, a separação obtida nestas condições apresentou picos simétricos e tempos de retenção adequados para todos os analitos. Infelizmente, apesar da eficaz ionização obtida no MS utilizando este reagente, o mesmo provocava entupimento do capilar do equipamento após certo período.

Em função dos resultados negativos obtidos com a utilização da detecção por MS, decidiu-se tentar o desenvolvimento do método utilizando a detecção UV em 222 nm, comprimento de onda de absorção máxima dos analitos. Neste comprimento de onda, observou-se a interferência de

compostos endógenos do plasma, os quais eluíam no início do cromatograma e prejudicavam a determinação dos analitos. Mudanças na fase móvel e na detecção (285 nm) foram executadas, porém sem sucesso. Desta forma, optou-se pela busca de separação dos analitos em outra coluna.

Figura 31. Separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição com o aditivo trifluoroacetato de amônio (TFANH₄). Condições cromatográficas: fase móvel: hexano-etanol (95:5, v/v) + TFANH₄ 0,1% (m/v); vazão: 1 mL min⁻¹; detecção UV em 285 nm; picos: (+)-(RS)-MQ (4,8 min); (-)-(SR)-MQ (7,0 min); CMQ (10,6 min).

A separação dos analitos foi então verificada na coluna Chirobiotic T, a qual apresenta o antibiótico macrocíclico teicoplanina como seletor quiral (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002). Esta coluna foi avaliada tanto no modo polar-orgânico quanto no modo reverso de eluição. A melhor separação dos enantiômeros da MQ obtida no modo reverso é apresentada na Figura 32. Embora a separação de linha de base tenha sido alcançada, o tempo de corrida total foi de 35 min, o que é uma grande desvantagem quando pretende-se aplicar o método na análise de muitas amostras. Além disso, CMQ não interagiu com a coluna nestas condições e eluiu no tempo morto de análise.

Figura 32. Separação dos enantiômeros da MQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo reverso de eluição. Condições cromatográficas: fase móvel: acetato de amônio 10 mol L⁻¹ pH 4,0-acetonitrila-metanol (20:70:10, v/v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹; detecção UV em 285 nm.

Por outro lado, o modo polar-orgânico ofereceu melhor separação dos analitos na coluna Chirobiotic T e as condições de análise foram avaliadas cuidadosamente. Sendo MQ um fármaco com grupos funcionais próximos aos centros quirais, TFANH₄ (0,1%, m/v) foi adicionado a todas as fases móveis testadas. A Figura 32 mostra que a proporção de acetonitrila e metanol na fase móvel influenciou consideravelmente a retenção e resolução dos analitos.

Figura 33. Efeito da composição da fase móvel sobre a retenção (k) e resolução (R_s) dos enantiômeros da MQ e retenção de CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição. Vazão: 0,6 mL min⁻¹. (□) k - (-)-(SR)-MQ; (■) k - (+)-(RS)-MQ; (▲) k - CMQ; (◆) R_s - MQ.

Embora uma resolução adequada dos enantiômeros da MQ tenha sido obtida utilizando somente acetonitrila como modificador orgânico na fase móvel, o metabólito ficou retido na fase estacionária. Por outro lado, CMQ não interagiu com a coluna e eluiu no tempo morto de análise quando somente metanol foi usado com solvente orgânico na fase móvel. Desta forma, a resolução adequada foi alcançada empregando ambos modificadores orgânicos na fase móvel. A separação otimizada dos analitos bem como os parâmetros cromatográficos obtidos são apresentados na Figura 34 e Tabela 13, respectivamente. Nestas condições, (-)-(SR)-MQ elui primeiro.

Figura 34. Separação otimizada dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição. Condições cromatográficas: acetonitrila-metanol (70:30, v/v) + trifluoroacetato de amônio 0,1% (m/v); vazão: 0,6 mL min⁻¹; detecção UV em 285 nm; picos: CMQ (6,3 min); (-)-(SR)-MQ (10,3 min); (+)-(RS)-MQ (13,1 min).

Tabela 13. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos enantiômeros da MQ e CMQ empregando a coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico de eluição*.

Analito	Fator de retenção	Fator de separação	Resolução	Número de pratos
CMQ	1,1	-	-	3953
(-)-(SR)-MQ	2,4	2,1	7,9	4623
(+)-(RS)-MQ	3,3	1,3	3,7	3681

*Condições cromatográficas descritas na Figura 34.

4.4.3 Otimização da extração empregando LPME

O próximo objetivo foi otimizar a extração dos analitos empregando LPME. A extração simultânea de MQ e CMQ tem sido um desafio devido às características opostas apresentadas por estes analitos, visto que o fármaco é uma base fraca ($pK_a = 8,5$) e o metabólito um ácido fraco ($pK_a = 4,5$) (GREEN et al., 1999). Na LLE convencional, duas estratégias são possíveis para a extração destes compostos. Na primeira abordagem, é realizada a extração em duas etapas, a qual requer o ajuste de pH em cada extração para manutenção do analito na forma neutra e passível de solvatação pelo solvente orgânico. Na segunda opção, o processo é realizado em uma única etapa, sendo que a extração do analito é realizada utilizando-se um reagente iônico de carga oposta ao do composto de interesse (formação de um complexo de moderada hidrofobicidade e capaz de sofrer extração por solventes orgânicos) enquanto que a extração do outro analito é feita por partição simples.

A primeira tentativa de extração realizada foi empregando pares iônicos. Os agentes carreadores em LPME têm sido aplicados principalmente para a extração de moléculas altamente hidrofílicas (HO et al., 2006). Desta forma, a extração simultânea foi idealizada executando a LPME em duas fases, em que a fase doadora apresentava o reagente iônico. Sendo MQ um composto de características moderadamente lipofílicas, decidiu-se avaliar a extração utilizando o carreador tetrabutilamônio, um reagente carregado positivamente e capaz de formar pares iônicos com o metabólito ácido, o qual apresenta carga negativa em meio alcalino. Portanto, o reagente foi adicionado na amostra na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e o pH foi ajustado para a faixa básica (~ 11) para manter o fármaco na forma neutra e o metabólito na forma ionizada e passível

de interagir com o carreador. Utilizando a fase aceptora tolueno:*n*-octanol (8:2, v/v) impregnado nos poros da membrana e 30 min de extração, os valores de recuperação alcançados foram considerados baixos para obtenção de um método com detectabilidade adequada empregando o detector UV (~13 e 25% para MQ e CMQ, respectivamente). Esta metodologia merece uma maior investigação para ser aplicada na determinação destes analitos.

Após estes testes preliminares com a LPME utilizando pares iônicos, optou-se por desenvolver o método realizando a extração em duas etapas. Primeiramente, a amostra foi alcalinizada para a extração de MQ. Em seguida, a mesma amostra foi acidificada para a extração de CMQ. A otimização dos parâmetros da LPME para a extração de MQ não foi realizada, visto que foram empregadas as condições previamente estabelecidas em outro trabalho de nosso grupo publicado recentemente (MAGALHÃES; BONATO, 2008). Por outro lado, duas variáveis importantes em um procedimento de LPME em três fases foram analisadas para a extração de CMQ das amostras de plasma: seleção do solvente orgânico e da fase aceptora.

4.4.3.1 Seleção do solvente orgânico

O solvente orgânico impregnado nos poros da membrana deve apresentar algumas características para ser utilizado em LPME em três fases (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Portanto, três solventes rotineiramente empregados foram avaliados neste experimento: *n*-octanol, éter hexílico e acetato de dodecila. De acordo com a Figura 35, o éter hexílico forneceu os melhores resultados e foi selecionado como solvente orgânico. De maneira

interessante, fármaco e metabólito apresentaram maiores taxas de extração tendo este solvente como fase orgânica.

Figura 35. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: adição de 100 μL de HCl 5 mol L^{-1} na fase doadora; fase aceptora: NaOH 50 mol L^{-1} ; tempo de extração: 30 min; velocidade de agitação: 1250 rpm; análises realizadas em triplicata.

4.4.3.2 Seleção da fase aceptora

Para a extração de ácidos fracos em LPME em três fases, a fase aceptora deve ser alcalina (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Desta forma, diferentes concentrações de hidróxido de sódio foram analisadas (10-100 mmol L^{-1}). Conforme observado na Figura 36, a maior área do pico foi obtida utilizando NaOH 50 mmol L^{-1} como fase aceptora. Outra fase aceptora composta de DEA também foi avaliada, porém foi rejeitada devido aos valores erráticos alcançados. Acredita-se que os resultados insatisfatórios obtidos na utilização de DEA como fase aceptora alcalina sejam devidos a relativa solubilidade da mesma na fase orgânica, levando a perdas durante a extração.

Figura 36. Seleção da fase aceptora. Condições de extração: adição de 100 μL de HCl 5 mol L^{-1} na fase doadora; solvente orgânico: éter hexílico; tempo de extração: 30 min; velocidade de agitação: 1250 rpm; análises realizadas em triplicata.

No intuito de desenvolver um método que possibilitasse o processamento de um número razoável de amostras, o tempo de extração foi fixado em 30 min, o qual forneceu taxas de extração satisfatórias para todos os analitos. Um cromatograma obtido da análise de plasma humano usando o método otimizado é mostrado na Figura 37. Nenhum dos compostos disponíveis no laboratório apresentou as características necessárias para ser empregado como padrão interno neste método (separação dos analitos de interesse com tempo de retenção desejável e perfil de extração compatível com o procedimento de extração em duas etapas). Logo, medidas rigorosas foram tomadas para a obtenção de valores de confiança dentro do esperado para a determinação de fármacos em fluidos biológicos.

Figura 37. Cromatograma obtido da análise de plasma humano fortificado com os enantiômeros da MQ (500 ng mL⁻¹ cada enantiômero) e CMQ (500 ng mL⁻¹) e processado conforme o método desenvolvido. Picos: 1, CMQ; 2, (-)-(SR)-MQ; 3, (+)-(RS)-MQ.

4.4.4 Validação do método desenvolvido

A validação do método foi feita de maneira similar a descrita no item 2.4.3, avaliando-se a linearidade, recuperação, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade. Durante a validação deste método, empregou-se a padronização externa para a determinação dos diferentes valores (áreas dos picos).

4.4.4.1 Linearidade

Os dados apresentados na Tabela 14 mostram linearidade satisfatória no intervalo de concentrações plasmáticas selecionado (50-1500 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da MQ e 50-3000 ng mL⁻¹ para CMQ), com coeficientes de determinação (r^2) > 0,99 para todos os analitos. Além disso, a ANOVA dos dados comprovou a significância das equações de regressão, não havendo falta de ajuste do modelo linear ($p > 0,05$).

Tabela 14. Linearidade do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.

Analito	Intervalo (ng mL ⁻¹)	Equação linear	r^2	ANOVA <i>lack-of-fit</i>	
				F	p
(-)-(SR)-MQ	50-1500	$y = 306,1x + 2729$	0,9926	0,44	0,73
(+)-(RS)-MQ	50-1500	$y = 303,8x + 3767$	0,9909	0,45	0,72
CMQ	50-3000	$y = 878,1x + 26520$	0,9962	0,19	0,89

 r^2 , coeficiente de determinação.

4.4.4.2 Limite de quantificação

O método desenvolvido permitiu a determinação de até 50 ng de cada enantiômero de MQ e CMQ por mL de plasma, o qual foi obtido com valores de coeficiente de variação e erros relativos inferiores a 20% (Tabela 15).

Tabela 15. Limite de quantificação do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.

Analito	Concentração obtida (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Erro relativo (%)
(-)-(SR)-MQ	49,8	11,5	-0,3
(+)-(RS)-MQ	55,1	16,6	10,3
CMQ	42,9	18,7	-14,1

análises em quintuplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

4.4.4.3 Recuperação

A recuperação foi avaliada utilizando-se de amostras fortificadas em três níveis de concentração (150, 750 e 1500 ng para os enantiômeros de MQ e 150, 1500 e 2500 ng de CMQ por mL de plasma), submetidas ao processo de extração e analisadas com base em curvas analíticas das soluções-padrão não-submetidas ao processo de extração.

Os valores de recuperação do método otimizado mantiveram-se entre 35 e 38% (Tabela 16). A recuperação dos enantiômeros da MQ foi discretamente maior que a obtida em nosso estudo publicado recentemente (MAGALHÃES; BONATO, 2008). Os valores de desvio-padrão relativo não superiores a 15% indicam boa repetibilidade do procedimento de extração.

Tabela 16. Recuperações médias do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.

Analito	Recuperação (%)	RSD (%)
(-)-(SR)-MQ	35,9	12,0
(+)-(RS)-MQ	36,6	11,6
CMQ	38,9	13,0

análises em triplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

4.4.4.4 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método desenvolvido, foram empregadas amostras de plasma fortificadas em três níveis de concentração plasmática (alta, média e baixa). A precisão e exatidão interensaios foram avaliadas durante três dias consecutivos em quintuplicata e a precisão e exatidão intraensaio foram feitas pela análise de cinco amostras no mesmo dia.

A Tabela 17 mostra os resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão. Através da análise dos valores observa-se que o método proposto apresenta alta precisão e exatidão, visto que os valores de desvio-padrão relativo e erros relativos mantiveram-se abaixo de 15%, aceitáveis para a análise de fármacos em fluidos biológicos.

Tabela 17. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.

	Intraensaio ($n = 5$) ^a			Interensaios ($n = 3$) ^b		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	E (%)
150 ng mL ⁻¹						
(-)-(SR)-MQ	130,8	14,4	-12,8	131,2	11,3	-12,6
(+)-(RS)-MQ	135,6	14,3	-9,6	130,8	11,6	-12,8
CMQ	141,6	5,6	-5,6	135,8	10,0	-9,5
750 ng mL ⁻¹						
(-)-(SR)-MQ	678,0	12,6	-9,6	698,2	13,8	-6,9
(+)-(RS)-MQ	669,5	11,4	-10,7	688,9	13,7	-8,1
1500 ng mL ⁻¹						
CMQ	1520,4	9,3	1,4	1413,9	9,2	-5,7
1250 ng mL ⁻¹						
(-)-(SR)-MQ	1154,6	5,0	-7,6	1101,9	5,0	-11,8
(+)-(RS)-MQ	1147,1	4,9	-8,2	1104,4	5,4	-11,7
2500 ng mL ⁻¹						
CMQ	2742,8	7,2	9,7	2425,3	12,4	-3,0

^aquintuplicata para cada concentração; ^banálises em três dias consecutivos; ^cdesvio-padrão relativo; ^derro relativo.

4.4.4.5 Estudo de estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da MQ e CMQ foi avaliada nas amostras mantidas à temperatura ambiente durante 12 h e após ciclos de congelamento e descongelamento, conforme recomendado na literatura vigente (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

De acordo com a Tabela 18, pode-se verificar que os analitos foram estáveis quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente ou

expostos a ciclos de congelamento e descongelamento (-20 e 25 °C, respectivamente), com valores de $p > 0,05$.

Tabela 18. Estudo de estabilidade* (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros de MQ e CMQ em plasma.

Analito	Valor de p			
	Ciclos de congelamento e descongelamento		Manutenção à temperatura ambiente	
	Baixa ^a	Alta ^b	Baixa ^a	Alta ^b
(-)-(SR)-MQ	0,21	0,06	0,51	0,32
(+)-(RS)-MQ	0,17	0,06	0,49	0,32
CMQ	0,30	0,07	0,87	0,08

*expresso pelo valor de p ; ^abaixa concentração analisada = 50 ng mL⁻¹ para todos os analitos; ^balta concentração analisada = 1250 e 2500 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da MQ e CMQ, respectivamente; análises em triplicata.

Embora não tenha sido avaliada a interferência de outros fármacos, o método foi seletivo frente aos componentes endógenos de plasma humano e de ratos, visto a ausência de interferentes no branco destas matrizes conforme evidenciado na Figura 38.

4.4.5 Aplicação do método desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo-piloto de disposição cinética em ratos. Para tanto, cloridrato de mefloquina racêmico foi administrado por via oral (gavagem) em suspensão aquosa na dose única de 50 mg/kg. Um cromatograma referente à análise de amostra de plasma de rato coletada 2 h após a administração do fármaco é mostrado na Figura 39.

Figura 38. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano (acima) e de ratos (abaixo) segundo o método desenvolvido.

Figura 39. Cromatograma obtido da análise de amostra de plasma de rato coletada 2 h após a administração oral de MQ e processada conforme o método desenvolvido. Picos: 1, CMQ; 2, (-)-(*SR*)-MQ; 3, (+)-(*RS*)-MQ.

A disposição cinética da MQ no plasma de ratos indica enantiosseletividade com maiores concentrações de (+)-(*RS*)-MQ em todos os tempos de coleta analisados (Figura 40). Este perfil é bastante similar ao observado em nosso trabalho publicado recentemente (MAGALHÃES; BONATO, 2008) e corrobora outros estudos relacionados à farmacocinética

enantiosseletiva de MQ nestes animais (SOURI; FARSAM; JAMALI, 1997; BAUDRY et al., 1997). Além disso, o resultado está de acordo com a investigação de Koch e Blaschke (1990), os quais verificaram maior taxa de biotransformação de (-)-(SR)-MQ em homogenatos hepáticos de ratos. De forma interessante, a enantiosseletividade de MQ em ratos é oposta a encontrada em humanos, em que maiores concentrações de (-)-(SR)-MQ são relatadas no plasma. Acredita-se que tais diferenças são oriundas principalmente do metabolismo e/ou excreção diferencial entre as espécies. As concentrações plasmáticas do principal metabólito em ratos foram menores que as observadas em estudos envolvendo humanos (SCHLAGENHAUF et al., 1996). Vale a pena ressaltar que outros metabólitos de MQ foram descritos em ratos, o que pode ter contribuído para o resultado observado (FONTAINE et al., 2000).

Figura 40. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) versus tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos após dose oral única de mefloquina racêmica (50 mg/kg; $n = 3$).

4.4.6 Avaliação do método desenvolvido

O método desenvolvido para análise dos enantiômeros de MQ e do metabólito aquiral CMQ constitui o primeiro procedimento descrito na literatura para a determinação simultânea destes analitos em plasma (Tabela 1). Durante o desenvolvimento do método, a separação destes analitos foi verificada tanto em colunas baseadas em polissacarídeos (Chiralcel OD-H) quanto em antibióticos (Chirobiotic T), sendo que a resolução obtida na coluna Chirobiotic T no modo polar-orgânico foi empregada no decorrer dos experimentos. Na preparação das amostras, a LPME em duas etapas para a extração de compostos com diferentes características ácido-base foi empregada com sucesso. Embora tenham sido obtidos valores de recuperação menores (35-38%) que outros métodos descritos na literatura, os quais utilizaram técnicas tradicionais de extração, a alta seletividade fornecida pelo procedimento de LPME em duas etapas proporcionou determinar estes analitos em níveis comparáveis (50 ng mL^{-1}).

5 ANÁLISE DO ARTEMÉTER E DIIDROARTEMISININA EM PLASMA

5.1 Introdução

A planta chinesa *Artemisia annua* (ou *qinghao*) é utilizada no tratamento da malária há milênios. Em meados da década de sessenta, cientistas chineses executaram vários estudos empregando ervas usadas na medicina tradicional daquele país em busca de possíveis agentes e, dentre as plantas testadas, descobriram que os extratos de *A. annua* apresentavam potente ação antimalárica (MESHNICK, 2002). Logo após, a molécula responsável por este efeito foi isolada e caracterizada, recebendo o nome de artemisinina (ATM – ou *qinghaosu*). Vários derivados foram produzidos devido a problemas de instabilidade do composto original e direcionados para a terapêutica da doença. Os resultados obtidos configuram uma das mais importantes descobertas de novos agentes na pesquisa de plantas medicinais (DHINGRA; RAO; NARASU, 2000).

ATM e derivados têm em comum a presença de um anel sesquiterpênico contendo uma ligação endoperóxido no interior (Figura 41). Embora o mecanismo de ação exato desta classe de fármacos antimaláricos seja desconhecido, estudos sugerem a necessidade da ligação endoperóxido neste processo, a qual é responsável pela formação de radicais livres prejudiciais ao parasita (VAN AGTMAEL; EGGELE; VAN BOXTEL, 1999). Além disso, ATM e derivados apresentam uma propriedade desejável dentre os antimaláricos: o breve início de ação, o qual promove a erradicação do *Plasmodium* em menor tempo (< 48 h) e tendo como consequência final a rápida resposta clínica com eliminação dos sinais e sintomas (WHITE, 2008).

Figura 41. Estruturas da artemisinina (esquerda) e dos derivados arteméter (meio) e diidroartemisinina (direita).

O arteméter (ART), um dos principais fármacos disponíveis para o tratamento da malária, surgiu devido a dificuldades encontradas no emprego do precursor ATM como medicamento. Diferentemente do composto original, ART apresenta um grupo metil éter ligado ao anel sesquiterpênico, o que confere propriedades adequadas para formulações oral e intramuscular (DHINGRA; RAO; NARASU, 2000). Além disso, o derivado semi-sintético ART é mais potente *in vitro* que ATM, tornando-o a opção de escolha na terapêutica da infecção, principalmente na ocasionada por cepas de *P. falciparum* resistentes a outros fármacos (WHITE, 2008).

ART apresenta metabolização hepática principalmente pela isoforma 2B6 do complexo enzimático citocromo P450 e tem como principal metabólito diidroartemisinina (DHA), o qual também apresenta ação antimalárica *in vitro* e *in vivo* (NAVARATNAM et al., 2000). Alguns autores sugerem que ART seja um pró-fármaco de DHA e a quantificação deste composto em fluidos biológicos é necessária para a monitorização da terapêutica (BORSTNIK et al., 2002).

A determinação de ART e DHA em fluidos biológicos é dificultada pelas propriedades físico-químicas destes analitos. Os fármacos desta classe são termicamente instáveis e não apresentam grupos cromóforos ou com potencial para reações de derivatização (CHRISTEN; VEUTHEY, 2001). Mesmo assim,

alternativas vêm sendo utilizadas para sobrepor estas dificuldades. Inicialmente, empregou-se HPLC com detecção UV dos produtos de decomposição de ART e DHA para a quantificação destes analitos em plasma (THOMAS; WARD; EDWARDS, 1992; MUHIA; MBERU; WATKINS, 1994). No entanto, estes métodos apresentam detectabilidade inadequada para aplicações em estudos de disposição cinética. Mais tarde, Mohamed et al. (1999) utilizaram esta mesma estratégia para a determinação destes compostos empregando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Porém, HPLC com detecção eletroquímica (ED) foi o procedimento mais empregado para a análise destes analitos em plasma até o final da década passada (NAVARATNAM et al., 1995; KARBWANG et al., 1997; SANDRENAN et al., 1997; VAN AGTMAEL et al., 1998). Tal fato deve-se principalmente a presença do grupo endoperóxido na estrutura destas moléculas, o qual sofre redução e pode ser aproveitado para fins de detecção. Embora métodos com seletividade e detectabilidade adequadas sejam descritos, a execução destes métodos é seriamente prejudicada pelos rigorosos procedimentos necessários para a desoxigenação do sistema e das amostras.

O uso de LC-MS na análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos tem contribuído para a obtenção de métodos com seletividade e detectabilidade desejáveis. Alguns métodos de análise do ART e metabólito utilizando esta técnica foram relatados recentemente na literatura e utilizam ESI e APCI como interfaces (SOUPPART et al., 2002; PEYS et al., 2005; SHI et al., 2006; HANPITHAKPONG et al., 2009). No entanto, todos os métodos descritos

empregam técnicas tradicionais de preparo de amostras, o que é prejudicial em termos de uso elevado de solventes orgânicos.

5.2 Objetivo específico

Desenvolver e validar método de análise do ART e do metabólito DHA em plasma empregando LPME com aplicação em um estudo piloto de disposição cinética em ratos.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Materiais

5.3.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes (metanol e acetonitrila) utilizados como constituintes das fases móveis (grau cromatográfico) e o sal acetato de amônio (grau p.a.) empregado no preparo das soluções-tampão foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema Milli-Q-Plus[®] (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

Os solventes utilizados na otimização do método empregando LPME foram tolueno (Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA), éter butílico, acetato de hexila e *n*-octanol, provenientes da Sigma (St. Louis, EUA), todos de grau cromatográfico ou analítico.

5.3.1.2 Soluções-padrão

Os padrões de ART e DHA utilizados na preparação das soluções-padrão foram gentilmente cedidos por Dafra Pharma (Turnhout, Bélgica).

Primeiramente, foram preparadas soluções estoque de ART e DHA em metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração 200 µg mL⁻¹. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de uso por diluição no mesmo sistema, nas concentrações de 10 µg mL⁻¹ para avaliação das colunas cromatográficas e otimização do método de extração. Da mesma forma, soluções-padrão nas concentrações de 0,2, 0,4, 1, 2, 4, 20 e 40 µg mL⁻¹ de ART e DHA foram preparadas para os experimentos de validação do método. Para obtenção das amostras-controle, foram preparadas soluções nas concentrações de 0,6, 16 e 30 µg mL⁻¹ de ART e DHA. Solução-padrão de ATM, obtida da Sigma (St. Louis, EUA) e utilizada como padrão interno, foi preparada em metanol na concentração de 20 µg mL⁻¹. Todas as soluções foram acondicionadas em tubos plásticos de polipropileno, estocadas a -20 °C e protegidas da luz durante todo o processo.

5.3.1.3 Amostras de plasma

As amostras de plasma utilizadas no desenvolvimento, validação e aplicação do método foram da mesma procedência e receberam o mesmo procedimento descrito no item 4.3.1.3.

5.3.1.4 Animais

Os animais utilizados neste experimento foram da mesma espécie e procedência e tiveram o mesmo tratamento descrito no item 3.3.1.4.

5.3.2 Equipamentos

5.3.2.1 Sistema cromatográfico

Utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico descrito no item 3.3.2.1. A interface ESI foi empregada no modo positivo e as temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 80 e 250 °C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem e de nebulização e o argônio como gás de colisão. A aquisição e tratamento de dados foram executados através do programa MassLynx, versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

As condições de otimização do MS-MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão (200 µg mL⁻¹) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão na vazão de 20 µL min⁻¹. As condições otimizadas para cada analito estão descritas na Tabela 19:

Tabela 19. Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM.

Analito	Reação monitorada	Voltagem do cone (kV)	Energia de colisão (eV)
ART	267 → 163	22	7
DHA	267 → 163	22	7
ATM	283 → 209	20	7

MRM, monitoramento de reações múltiplas.

5.3.2.2 Equipamentos e materiais utilizados em LPME

Durante a etapa de preparação das amostras empregando a LPME, foram utilizados agitadores magnéticos obtidos da Fisatom Equipamentos Científicos, modelo 752A (São Paulo, Brasil). Outros materiais empregados na otimização do procedimento de LPME incluíram: frascos âmbar de vidro com capacidade para 4 mL (Supelco, Bellefonte, EUA), membranas capilares de polipropileno, modelo Accurel PP Q 3/2 (600 µm de diâmetro interno, 200 µm

de espessura da parede e 0,2 μm de tamanho dos poros - Membrana, Wuppertal, Alemanha), barras de agitação magnética, de dimensões 10 mm x 3 mm (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e microseringas *gas tight* com capacidade para 250 μL (modelo 1725RN – Hamilton, Reno, EUA).

5.3.2.3 Outros equipamentos

Para verificação do comprimento de onda de absorção máxima dos analitos foi empregado um espectrofotômetro UV-Vis-NIR, modelo U-3501 (Hitachi, Tokyo, Japão), juntamente com celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Um pHmetro Orion modelo 420A+ também foi utilizado e obtido da Thermo Electron Corporation (Waltham, EUA).

5.3.2.4 Colunas cromatográficas

Para a escolha de uma coluna apropriada e eficiente para a separação dos analitos, foram avaliadas colunas cromatográficas convencionais de fase reversa LiChrospher CN e C₁₈ com 150 x 4,6 mm e proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha) e uma coluna de sílica zirconizada, recoberta com polimetiltetradecilsiloxano e submetida ao processo de capeamento (150 x 3,9 mm), confeccionada pelo Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LABCROM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de acordo com a metodologia descrita por Faria et al. (2008). Todas as colunas testadas apresentavam partículas de 5 μm .

5.3.3 Métodos

5.3.3.1 Avaliação das colunas cromatográficas

Para avaliação das colunas cromatográficas, 25 µL das soluções-padrão dos analitos na concentração de 200 µg mL⁻¹ foram transferidos para tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado à secura sob vácuo, os resíduos foram dissolvidos em 100 µL da fase móvel e 50 µL foram cromatografados. A detecção foi feita empregando o detector UV-Vis em 210 nm. As injeções foram realizadas somente após o condicionamento da coluna com a fase móvel e estabilização da linha de base. As fases móveis empregadas no modo reverso foram previamente filtradas a vácuo através de uma membrana da Millipore (São Paulo, Brasil) com poros de 0,45 µm e mantidas no banho ultrassônico durante 5 min. No final da avaliação diária, procedeu-se lavagem das colunas com solvente orgânico e água na mesma proporção da fase móvel.

5.3.3.2 Microextração em fase líquida

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando-se alíquotas de 1 mL de plasma fortificado com 25 µL de solução-padrão de cada analito. Fez-se diluição com água purificada para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma livres dos analitos, bem como alíquotas de água purificada também foram processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Para cada extração, uma seção de membrana capilar de polipropileno, de 7 cm de comprimento e fixada nas extremidades com o auxílio de microseringas foi imersa durante 15 s no solvente orgânico para sua

deposição nos poros da membrana. Após a impregnação, cerca de 20 µL de solvente orgânico foram introduzidos no interior da membrana capilar, utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar então foi imersa na fase doadora (matriz contendo os analitos) e iniciada a extração sob agitação magnética (1100 rpm). Após o tempo necessário de extração, o solvente orgânico foi retirado da membrana usando outra microseringa e transferido para um tubo plástico de polipropileno. Finalmente, o extrato foi evaporado à secura sob vácuo, sendo então dissolvido em 100 µL de fase móvel e 50 µL injetados no sistema cromatográfico.

Na avaliação do procedimento de extração empregando LPME em duas fases, a influência dos seguintes parâmetros foi avaliada: tipo de solvente orgânico, adição de sais na fase doadora e tempo de extração.

5.3.3.3 Validação do método desenvolvido

A validação do método foi realizada de maneira semelhante à descrita no item 3.3.3.4. No entanto, o procedimento realizado contemplou o intervalo de concentrações alcançados no plasma após a administração de doses terapêuticas do fármaco em humanos (Tabela 20). Neste método, a padronização interna (razão de áreas) foi utilizada para os cálculos dos diferentes parâmetros.

Tabela 20. Concentrações avaliadas na validação do método de análise do ART e DHA em plasma.

Parâmetro	Concentrações avaliadas (ng mL^{-1})	
	ART	DHA
Linearidade	5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000	5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000
Limite de quantificação	5	5
Recuperação	15, 400, 750	15, 400, 750
Precisão e exatidão	15, 400, 750	15, 400, 750
Estabilidade	15, 750	15, 750

5.3.3.4 Aplicação do método desenvolvido

Os animais foram mantidos em jejum de 12 h, recebendo apenas água e, ao final do período, receberam arteméter dissolvido em óleo de soja na dose única de 120 mg/kg por via oral (gavagem). Alimentação foi oferecida aos animais, aproximadamente 1 hora após a administração do fármaco.

As amostras de sangue (6 mL) foram colhidas por decaptação nos tempos 1/2, 1, 2, 4, 6 e 8 h após a administração ($n = 3$ para cada tempo de coleta), utilizando-se heparina (Liquemine 25.000 UI, Roche) como anticoagulante. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 g, 10 min, 4 °C) foram armazenados a -20 °C e sob proteção da luz até o momento da análise.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela CEUA do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Detecção e separação cromatográfica de ART e DHA

Devido à absorção inadequada destes analitos no UV, o desenvolvimento do método para análise de ART e DHA foi feito empregando LC-MS-MS e, portanto, procurou-se obter a resolução cromatográfica utilizando o modo reverso de eluição para facilitar a ionização das moléculas. Diferentemente de grande parte dos compostos analisados por MS, as moléculas protonadas de ART e DHA têm baixa intensidade (HANPITHAKPONG et al., 2009). Por outro lado, os fragmentos ($MH^+ - CH_3OH$) m/z 267 e ($MH^+ - CH_3OH - C_2H_5OH$) m/z 221 para ART e ($MH^+ - OH$) m/z 267 e ($MH^+ - OH - C_2H_5OH$) m/z 221 para DHA são frequentemente monitorados para fins de quantificação tanto em ESI quanto APCI (SOUPPART et al., 2002; PEYS et al., 2005; SHI et al., 2006). Neste estudo, ambos analitos tiveram o mesmo íon precursor (m/z 267) de maior intensidade e, após definir CID, o íon produto predominante para ambos foi m/z 163. Desta forma, embora fosse utilizado LC-MS-MS no modo MRM, houve a necessidade de separação cromatográfica de fármaco e metabólito para obtenção de um método seletivo (SHI et al., 2006). Vale ressaltar que o padrão interno ATM apresentou espectro de massas diferente de ART e DHA e foi monitorado a partir da transição m/z 283 $\rightarrow$ 209.

A melhor separação dos analitos foi alcançada usando a coluna Si-Zr-PMTDS, a qual contém o polímero polimetiltetradecilsiloxano na fase estacionária e apresenta propriedades de retenção intermediárias entre C_8 e C_{18} . Além disso, o processo de capeamento dos grupos silanóis residuais efetuado e a maior estabilidade conferida pela adição de zircônio ao suporte de

sílica são desejáveis para uma coluna de fase reversa (FARIA et al., 2008). A baixa proporção de água (20%) e a baixa concentração de sais (10 mmol L⁻¹) na fase móvel bem como o tempo reduzido de análise (< 5 min) são condições bastante atrativas para serem empregadas em LC-MS-MS. Adicionalmente, o resultado está de acordo com o normalmente visto em fase reversa, em que metabólitos (mais polares) eluem primeiro. A separação obtida é evidenciada na Figura 42:

Figura 42. Separação de ART e DHA empregando a coluna Si-Zr-PMTDS. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol-acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 5,0 (80:20, v/v); vazão: 1 mL min⁻¹; picos: DHA (2,3 min); ART (3,9 min).

O método foi desenvolvido com a coluna Si-Zr-PMTDS, como parte da colaboração científica mantida com o grupo de pesquisa da UNICAMP, cujo objetivo é avaliar o emprego de colunas contendo novas fases estacionárias para HPLC. Vale ressaltar que a separação obtida com a coluna recentemente desenvolvida também pode ser alcançada utilizando-se colunas convencionais de fase reversa (PEYS et al., 2005; HANPITHAKPONG et al., 2009).

5.4.2 Otimização da extração empregando LPME

Para a otimização do procedimento de extração, foram avaliados três parâmetros fundamentais: tipo de solvente orgânico, adição de sais na amostra e tempo de extração. O pH das amostras de plasma não foi ajustado sendo realizada somente a diluição com água para diminuir a viscosidade do meio, bem como a interação dos analitos com proteínas plasmáticas.

5.4.2.1 Seleção do solvente orgânico

Diferentemente dos outros antimaláricos e respectivos metabólitos estudados, para os quais a LPME em três fases foi usada na preparação das amostras, ART e DHA são moléculas neutras e, desta forma, passíveis de extração utilizando LPME em duas fases. Neste processo, o solvente orgânico depositado nos poros da membrana compõe também a fase aceptora presente no lúmen da mesma (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Na extração em duas fases, o solvente orgânico não deve apresentar ponto de ebulição demasiadamente alto caso seja necessária a secagem do extrato e posterior dissolução do resíduo na fase móvel. Portanto, tolueno, tolueno-*n*-octanol (1:1, v/v), éter butílico e acetato de hexila foram avaliados. Conforme observado na Figura 43, embora diferentes fases aceptoras tenham propiciado a recuperação de ART das amostras de plasma, somente a fase orgânica composta de tolueno-*n*-octanol (1:1, v/v) forneceu taxas de extração consideráveis para DHA.

Figura 43. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: tempo de extração: 30 min; velocidade de agitação: 1100 rpm; análises realizadas em triplicata.

Com o objetivo de aumentar a capacidade de processamento das amostras, a injeção direta do extrato foi avaliada porém sem sucesso visto a deformação dos picos e alteração dos tempos de migração dos analitos. Devido a problemas de estabilidade do ART quando exposto ao ar comprimido, a secagem dos extratos foi realizada sob vácuo.

5.4.2.2 Adição de sais na amostra

Em alguns métodos descritos na literatura para determinação de ART e DHA em plasma empregando LLE, foi relatada a adição de sais na amostra para obtenção do efeito *salting-out* (NAVARATNAM et al., 1995; SANDRENAN et al., 1997; VAN AGTMAEL et al., 1998; SOUPPART et al., 2002; PEYS et al., 2005). Neste trabalho, a adição de cloreto de sódio foi realizada nas diferentes concentrações de 5, 10 e 15% (m/v). De acordo com a Figura 44, observa-se que houve leve aumento na extração de DHA com a adição de sais na amostra, porém com significativa diminuição na recuperação de ART do plasma. Desta forma, o efeito *salting-out* foi evidenciado somente para o

metabólito DHA, o qual apresenta maior polaridade que o precursor ART. Por outro lado, acredita-se que o aumento da viscosidade da fase doadora provocado pelo incremento da força iônica tenha prejudicado a difusão do fármaco em direção à fase aceptora presente na membrana capilar.

Figura 44. Adição de sais na amostra. Condições de extração: solvente orgânico: tolueno-*n*-octanol (1:1, v/v); tempo de extração: 30 min; velocidade de agitação: 1100 rpm; análises realizadas em triplicata.

5.4.2.3 Tempo de extração

No desenvolvimento de um método empregando LPME em duas fases na preparação das amostras, é importante o estudo do tempo de extração para otimização do procedimento devido à influência deste parâmetro no processo. No ensaio efetuado, o tempo de extração foi avaliado no intervalo de 15-60 min. Conforme visto na Figura 45, houve acréscimo na extração dos analitos até 30 min de extração com posterior decréscimo nos demais tempos avaliados. Acredita-se que a perda do solvente orgânico presente na membrana capilar quando exposto a tempos de extração prolongados tenha contribuído para o resultado obtido (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2005).

Figura 45. Tempo de extração. Condições de extração: solvente orgânico: tolueno-*n*-octanol (1:1, v/v); velocidade de agitação: 1100 rpm; análises realizadas em triplicata.

5.4.3 Validação do método desenvolvido

Após a etapa de otimização do procedimento de LPME em duas fases, foi necessária a validação do método desenvolvido previamente a utilização na análise de amostras reais no intuito de verificar a adequação do mesmo aos objetivos propostos.

Da mesma forma que afirmado no capítulo anterior, a validação do método foi realizada de acordo com os critérios descritos no item 3.3.3.4, avaliando-se a linearidade, recuperação, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade. Durante o processo de validação, empregou-se ATM como padrão interno, visto a semelhança estrutural com ART e DHA (Figura 41), o qual propiciou perfis cromatográficos (tempo de retenção próximo aos dos analitos de interesse) e de extração desejáveis (recuperação absoluta em torno de 35%).

5.4.3.1 Linearidade

O método desenvolvido foi linear no amplo intervalo de 5-1000 ng mL⁻¹ com coeficientes de determinação de 0,9931 e 0,9925 para ART e DHA, respectivamente. Além disso, a linearidade das curvas analíticas foi comprovada pelo teste do ajuste do modelo linear (Tabela 21).

Tabela 21. Linearidade do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.

Analito	Intervalo (ng mL ⁻¹)	Equação linear	r^2	ANOVA <i>lack-of-fit</i>	
				F	p
ART	5-1000	$y = 0,035x - 0,0323$	0,9931	0,02	0,99
DHA	5-1000	$y = 0,002x + 0,0152$	0,9925	1,47	0,30

r^2 , coeficiente de determinação.

5.4.3.2 Limite de quantificação

Os limites de quantificação escolhidos para o método desenvolvido foram os menores pontos das curvas analíticas de ART e DHA (5 ng mL⁻¹), os quais estão de acordo com a literatura atual para análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos com valores de precisão e exatidão menores que 20% (Tabela 22).

Tabela 22. Limite de quantificação e recuperação absoluta do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.

Analito	Concentração obtida (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Erro relativo (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
ART	4,9	6,0	-1,4	32,5	8,0
DHA	5,8	13,3	15,3	25,8	7,4

RSD, desvio-padrão relativo.

5.4.3.3 Recuperação

As médias de recuperação absoluta do método desenvolvido nos três níveis de concentração estudados foram 32 e 25% para ART e DHA, respectivamente, com valores de desvio-padrão relativo menores que 10% para ambos analitos (Tabela 22). A maior eficiência na extração de ART das amostras de plasma provavelmente deve-se ao caráter lipofílico do fármaco, resultando em maior afinidade pela fase aceptora orgânica.

5.4.3.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método desenvolvido foram avaliadas em estudos intraensaio e interensaios em três níveis de concentração (alta, média e baixa). Conforme exposto na Tabela 23, verifica-se que o método apresentou valores de acordo com limites de confiança estabelecidos para estes parâmetros de validação.

5.4.3.5 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade realizado compreendeu ensaios de manutenção das amostras de plasma à temperatura ambiente durante 12 h e submissão a ciclos de congelamento e descongelamento com posterior análise e comparação dos resultados com os obtidos de amostras frescas.

De acordo com a Tabela 24, os analitos foram estáveis quando expostos a três ciclos de congelamento e descongelamento (-20 e 25 °C, respectivamente), com valores de $p > 0,05$. Porém, analisando os valores obtidos para o estudo de estabilidade à temperatura ambiente (25 °C), verifica-se diferenças entre as amostras de DHA mantidas durante 12 h nesta condição

e as recém-preparadas ($p < 0,05$). Este resultado é concordante com pesquisas recentes as quais relatam a limitada estabilidade de DHA em amostras de plasma mantidas por períodos prolongados à temperatura ambiente (SOUPPART et al., 2002; SHI et al., 2006). Desta forma, todas as amostras foram processadas em um período menor que 2 h com o objetivo de evitar a degradação de DHA presente no plasma, conforme recomendado por Shi et al. (2006). Diferentemente do metabólito, ART foi estável quando mantido durante 12 h à temperatura ambiente ($p > 0,05$).

Tabela 23. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.

	Intraensaio ($n = 5$) ^a			Interensaios ($n = 3$) ^b		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	E (%)
15 ng mL ⁻¹						
ART	15,0	5,2	-0,1	15,7	8,7	4,6
DHA	15,3	5,1	2,0	14,9	7,4	-0,9
400 ng mL ⁻¹						
ART	428,5	3,8	7,1	428,8	4,2	7,2
DHA	373,2	4,4	-6,7	376,2	6,2	-6,0
750 ng mL ⁻¹						
ART	772,1	3,6	2,9	751,5	5,1	0,2
DHA	692,8	6,2	-7,6	675,9	6,6	-9,9

^aquintuplicata para cada concentração; ^banálises em três dias consecutivos; ^cdesvio-padrão relativo; ^derro relativo.

A análise de plasma humano e de ratos evidenciou a seletividade do método desenvolvido, conferindo cromatogramas isentos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse (Figuras 46 e 47).

Tabela 24. Estudo de estabilidade^a (ciclos de congelamento e descongelamento e manutenção à temperatura ambiente) do método desenvolvido para determinação de ART e DHA em plasma.

Analito	Valor de <i>p</i>			
	Ciclos de congelamento e descongelamento		Manutenção à temperatura ambiente	
	Baixa	Alta	Baixa	Alta
ART	0,20	0,63	0,26	0,74
DHA	0,12	0,19	0,00	0,00

^aexpresso pelo valor de *p*; análises em triplicata.

Figura 46. Cromatogramas referentes à análise de branco de plasma humano (esquerda) e de ratos (direita) segundo o método desenvolvido.

Figura 47. Cromatogramas referentes à análise de amostra de plasma fortificado com ART e DHA na concentração de 10 ng mL⁻¹ e ATM (padrão interno) na concentração de 500 ng mL⁻¹ segundo o método desenvolvido. Picos: 1, ATM; 2, DHA; 3, ART.

5.4.4 Aplicação do método desenvolvido

A última etapa do estudo compreendeu a aplicação do método desenvolvido na análise de plasma de ratos. No estudo-piloto de disposição cinética, os animais receberam arteméter dissolvido em óleo de soja por via oral (gavagem), na dose única de 120 mg/kg.

Figura 48. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) *versus* tempo de coleta referente à análise de amostras de plasma de ratos após dose oral única de arteméter (120 mg/kg; $n = 3$).

Conforme visto na Figura 47, foram observadas maiores concentrações de DHA em relação a ART no período estudado (1/2 – 8 h), corroborando um amplo estudo de farmacocinética destes analitos em ratos (LI et al., 1998). Além disso, o resultado está de acordo com a hipótese que ART sofra extensiva metabolização pré-sistêmica e seja, na realidade, um pró-fármaco de DHA (MAGGS et al., 2000).

5.4.5 Avaliação do método desenvolvido

O método desenvolvido para a análise de ART e do metabólito DHA em plasma empregou a LPME em duas fases na preparação das amostras e LC-MS-MS como técnica analítica. A separação destes analitos no modo reverso de eluição foi alcançada com sucesso em uma coluna recentemente desenvolvida contendo Si-Zr-PMTDS como fase estacionária e resultou em um tempo de análise menor que 5 min. Devido ao caráter neutro dos analitos, a extração dos mesmos foi executada utilizando-se LPME em duas fases, a qual forneceu valores de recuperação absoluta de 32 e 25% para ART e DHA, respectivamente, os quais estão de acordo com os dados relatados em outros métodos bioanalíticos utilizando este modo da técnica. O método desenvolvido foi validado e a alta seletividade associada ao poder de detecção de LC-MS-MS no modo MRM possibilitaram determinar os analitos em baixas concentrações (até 5 ng mL⁻¹).

6 CONCLUSÕES

Nesta tese, os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para a determinação de alguns antimaláricos e respectivos metabólitos em plasma foram apresentados e discutidos. Os métodos para a análise de CQ e metabólitos bem como de MQ e metabólito foram desenvolvidos utilizando HPLC com colunas quirais para a separação dos enantiômeros destes analitos. Dentre as colunas avaliadas, verificou-se alta capacidade de separação das colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos (Chirobiotic V e Chirobiotic T), especialmente no modo polar-orgânico de eluição. Adicionalmente, a aplicação da coluna recentemente desenvolvida contendo Si-Zr-PMTDS como fase estacionária no modo reverso forneceu eficaz separação de ART e metabólito com tempo de análise reduzido. Embora nenhum dos métodos tenha empregado CE como técnica analítica, os estudos envolvendo esta técnica para separação de MQ e metabólito demonstraram algumas propriedades desejáveis da mesma, como alta seletividade e versatilidade associadas ao uso reduzido de reagentes. Do mesmo modo, a utilização de MS no modo MRM positivo para a quantificação de CQ e metabólitos e ART e metabólito foi fundamental para a obtenção de limites de quantificação adequados. Todos os métodos descritos foram desenvolvidos usando a LPME como técnica de extração e os diferentes valores de recuperação alcançados para os analitos, embora menores que os relatados em métodos empregando técnicas tradicionais de extração, foram suficientes para obtenção de precisão, exatidão e detectabilidade similares a outros métodos descritos na literatura. A grande vantagem da LPME foi o consumo praticamente nulo de solventes orgânicos na preparação das

amostras. Finalmente, cada método desenvolvido e validado foi aplicado com sucesso em estudos piloto de disposição cinética em ratos. Os dados obtidos sugerem enantiosseletividade na disposição cinética de CQ e MQ nestes animais após dose oral dos respectivos racematos, bem como maiores concentrações de DHA após a administração de ART. Desta forma, os resultados alcançados confirmam a viabilidade da LPME para extração destes antimaláricos e respectivos metabólitos de amostras de plasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ALTRIA, K. D. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications**. New Jersey: Humana Press, 1996.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. Chichester: Wiley, 2003.

AUBRY, A. F.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R.; WAINER, I. W. Enantioselective chromatography of the antimalarial agents chloroquine, mefloquine, and enpiroline on a α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase: evidence for a multiple-site chiral recognition mechanism. **Chirality**, New York, v. 4, p. 30-5, 1992.

AUGUSTIJNS, P.; VERBEKE, N. HPLC method for the determination of chloroquine and its main metabolite in biological samples. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v. 13, p. 1203-13, 1990.

AUGUSTIJNS, P.; VERBEKE, N. Stereoselectivity in the disposition of chloroquine and desethylchloroquine in rabbits. **Arzneim. Forsch.**, Aulendorf, v. 42, p. 825-8, 1992.

AUGUSTIJNS, P.; VERBEKE, N. Stereoselective pharmacokinetic properties of chloroquine and de-ethyl-chloroquine in humans. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 24, p. 259-69, 1993.

AUGUSTIJNS, P.; PEETERS, L.; CROES, K.; VERBEEKE, R. K. Stereoselective de-ethylation of chloroquine in rat liver microsomes. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, Genève, v. 24, p. 105-8, 1999.

BAKHTIAR, R.; MAJUMDAR, T. K. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v. 55, p. 227-43, 2007.

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

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

BASCO, L. K.; GUILLOTIN, C.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R.; LE BRAS, J. In vitro activity of the enantiomers of mefloquine, halofantrine and enpiroline against *Plasmodium falciparum*. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 33, p. 517-20, 1992.

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

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

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

BORSTNIK, K.; PAIK, I.; SHAPIRO, T. A.; POSNER, G. H. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 32, p. 1661-7, 2002.

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

BROCKS, D. R.; SKEITH, K. J.; JOHNSTON, C.; EMAMIBAFRANI, J.; DAVIS, P.; RUSSELL, A. S.; JAMALI, F. Hematologic disposition of hydroxychloroquine enantiomers. **J. Clin. Pharmacol.**, Thousand Oaks, v. 34, p. 1088-97, 1994.

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

CHANKVETADZE, B.; BURJANADZE, N.; BLASCHKE, G. Enantioseparation of erythro-mefloquine and its analogues in capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 32, p. 41-9, 2003.

CHAULET, J. F.; MOUNIER, C.; SOARES, O.; BRAZIER, J. L. High-performance liquid chromatographic assay for chloroquine and its two major metabolites, desethylchloroquine and bidesethylchloroquine in biological fluids. **Anal. Lett.**, New York, v. 24, p. 665-82, 1991.

CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J. L. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. **Curr. Med. Chem.**, Schiphol, v. 8, p. 1827-39, 2001.

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

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 CE. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p. 1081-91, 2007.

DHINGRA, V.; VISHWESHWAR, R.; NARASU, L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Life Sci.**, Oxford, v. 66, p. 279-300, 2000.

DESAI, M. J.; ARMSTRONG, D. W. Transforming chiral liquid chromatography methodologies into more sensitive liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry without losing enantioselectivity. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1035, p. 203-10, 2004.

DONATELLI, P.; MARCHI, G.; GIULIANI, L.; GUSTAFSSON, L. L.; PACIFICI, G. M. Stereoselective inhibition by chloroquine of histamine N-methyltransferase in the human liver and brain. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 47, p. 345-9, 1994.

DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 31, p. 257-74, 1996.

DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Rapid and simple method to determine chloroquine and its desethylated metabolites in human microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 698, p. 243-50, 1997.

ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceutical compounds and their metabolites in biological fluids. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 40, p. 509-15, 2006.

FANALI, S.; CAMERA, E. Use of cyclodextrins in the capillary electrophoretic separation of erythro- and threo-mefloquine enantiomers. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 745, p. 17-23, 1996.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 875, p. 89-122, 2000.

FARIA, A. M.; SILVA, C. R.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Development of a polymer-coated stationary phase with improved chemical stability in alkaline mobile phases. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 31, p. 953-60, 2008.

FINK, E.; MINET, G; NICKEL, P. Chloroquine enantiomers. Activity against *P. vinckei* and binding on DNA. **Arzneim. Forsch.**, Aulendorf, v. 29, p. 163-4, 1979.

FLANAGAN, R. J.; MORGAN, P. E.; SPENCER, E. P.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomed. Chromatogr.**, London, v. 20, p. 530-8, 2006.

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

FRIEDBERG, M. A.; HINSDALE, M.; SHIHABI, Z. K. Effect of pH and ions in the sample on stacking in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 781, p. 35-42, 1997.

FU, S.; BJÖRKMAN, A.; WÅHLIN, B.; OFORI-ADJEI, D.; ERICSSON, O.; SJÖQVIST, F. In vitro activity of chloroquine, the two enantiomers of chloroquine, desethylchloroquine and pyronaridine against *Plasmodium falciparum*. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 22, p. 93-6, 1986.

GEISER, L.; VEUTHEY, J. L. Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p. 45-57, 2007.

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

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

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

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

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

GÜBITZ, G.; SCHIMID, M. G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1204, p. 140-56, 2008.

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

HABERKORN, A.; KRAFT, H. P.; BLASCHKE, G. Antimalarial activity of the optical isomers of chloroquine diphosphate. **Tropenmed. Parasitol.**, Stuttgart, v. 30, p. 308-12, 1979.

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

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

HANPITHAKPONG, W.; KAMANIKOM, B.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N. A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma. **Bioanalysis**, London, v. 1, p. 37-46, 2009.

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

HEUERMANN, M.; BLASCHKE, G. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 648, p. 267-74, 1993.

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

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 44, p. 308-16, 2006.

HOLDER, N. L.; CHEN, T. M.; MADLINGER, A. C. Applications of ammonium trifluoroacetate as an additive for elution of chiral acids and bases from derivatized polysaccharide stationary phases. **Chirality**, New York, v. 17, p. S84-92, 2005.

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

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

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; MOLUNTO, P.; BANMAIRUROI, V.; CONGPUONG, K. Determination of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, in plasma using high-performance liquid chromatography

with eletrochemical detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 690, p. 259-65, 1997.

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

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

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

KOPPENHOEFER, B.; EPPERLEIN, U.; CHRISTIAN, B.; YIBING, J.; YUYING, C.; BINGCHENG, L. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part I: γ -cyclodextrin as chiral solvating agent. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 717, p. 181-90, 1995.

KOPPENHOEFER, B.; EPPERLEIN, U.; XIAOFENG, Z.; BINGCHENG, L. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part IV: hydroxypropyl- γ -cyclodextrin as chiral solvating agent. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 924-30, 1997.

KOPPENHOEFER, B.; EPPERLEIN, U.; SCHLUNK, R.; XIAOFENG, Z.; BINGCHENG, L. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part V: hydroxypropyl- α -cyclodextrin as chiral solvating agent. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 793, p. 153-64, 1998.

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

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

LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 624, p. 253-68, 2008.

LI, Q. G.; PEGGINS, J. O.; FLECKENSTEIN, L. L.; MASONIC, K.; HEIFFER, M. H.; BREWER, T. G. The pharmacokinetics and bioavailability of

dihydroartemisinin, arteether, artemether, artesunic acid and artemilic acid in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 50, p. 173-82, 1998.

MAGALHÃES, I. R. S. Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma: avaliação da técnica de microextração em fase líquida. Ribeirão Preto, 2006. 120 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 46, p. 929-36, 2008.

MAGGS, J. L.; BISHOP, L. P. D.; EDWARDS, G.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A.; WINSTANLEY, P. A.; PARK, B. K. Biliary metabolites of β -artemether in rats: biotransformations of an antimalarial endoperoxide. **Drug. Metab. Dispos.**, Baltimore, v. 28, p. 209-17, 2000.

MARQUET, P. Progress of liquid-chromatography – mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 24, p. 255-76, 2002.

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

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. R.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 60, p. 301-15, 1996.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 32, p. 1655-60, 2002.

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

MOHAMED, S. S.; KHALID, S. A.; WARD, S. A.; WAN, T. S.; TANG, H. P.; ZHENG, M.; HAYNES, H. K.; EDWARDS, G. Simultaneous determination of artemether and its major metabolite dihydroartemisinin in plasma by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 731, p. 251-60, 1999.

MUHIA, D. K.; MBERU, E. K.; WATKINS, W. M. Differential extraction of artemether and its metabolite dihydroartemisinin from plasma and determination by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 60, p. 196-9, 1994.

MÜLLER, D.; BLASCHKE, G. Enantioselective assay of chloroquine and its main metabolite deethylchloroquine in human plasma by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 38, p. 435-40, 2000.

NAVARATNAM, V.; MANSOR, S. M.; CHIN, L. K.; MORDI, M. N.; ASOKAN, M.; NAIR, N. K. Determination of artemether and dihydroartemisinin in blood plasma by high-performance liquid chromatography for application in clinical pharmacological studies. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 699, p. 289-94, 1995.

NAVARATNAM, V.; MANSOR, S. M.; SIT, N. W.; GRACE, J.; LI, Q.; OLLIARO, P. Pharmacokinetics of artemisinin-type compounds. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 39, p. 255-70, 2000.

OFORI-ADJEI, D.; ERICSSON, O.; LINDSTRÖM, B.; SJÖQVIST, F. Protein binding of chloroquine enantiomers and desethylchloroquine. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 22, p. 356-8, 1986.

OFORI-ADJEI, D.; ERICSSON, O.; LINDSTRÖM, B.; HERMANSSON, J.; ADJEPON-YAMOA, K.; SJÖQVIST, F. Enantioselective analysis of chloroquine and desethylchloroquine after oral administration of racemic chloroquine. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 8, p. 457-61, 1986.

PAWLISZYN, J.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical microextraction: current status and future trends. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 44, p. 291-307, 2006.

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

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

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. U. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1184, p. 132-42, 2008.

PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Applications of LC-MS to quantitation and evaluation of the environmental fate of chiral drugs and their metabolites. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 27, p. 836-46, 2008.

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

PEYS, E.; VANDENKERCKHOVE, J., VAN HEMEL, J.; SAS, B. Simultaneous determination of β -artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma and urine by a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay using electrospray ionization. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 61, p. 637-41, 2005.

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

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

PROJEAN, D.; BAUNE, B.; FARINOTTI, R.; FLINOIS, J. P.; BEAUNE, P.; TABURET, A. M.; DUCHARME, J. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v. 31, p. 748-54, 2003.

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

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

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

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 3079-106, 2001.

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

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

SALAKO, L. A.; AJAYI, F. O. Distribution and urinary excretion of the desethylmetabolites of chloroquine in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 39, p. 859-60, 1987.

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

SANDRENAN, N.; SIOUFI, A.; GODBILLON, J.; NETTER, C.; DONKER, M.; VAN VALKENBURG, C. Determination of artemether and its metabolite, dihydroartemisinin, in plasma by high-performance liquid chromatography and eletrochemical detection in the reductive mode. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 691, p. 145-53, 1997.

SCHLAGENHAUF, P.; STEFFEN, R.; LOBEL, H.; JOHNSON, R.; LETZ, R.; TSCHOPP, A.; VRANJES, N.; BERGQVIST, Y.; ERICSSON, O.; HELLGREN, U.; ROMBO, L.; MANNINO, S.; HANDSCHIN, J.; STÜRCHLER, D. Mefloquine tolerability during chemoprophylaxis: focus on adverse event assessments, stereochemistry and compliance. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 1, p. 485-94, 1996.

SCHLITZER, M. Antimalarial drugs – What is in use and what is in the pipeline. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, Weinheim, v. 341, p. 149-63, 2008.

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

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

SHI, B.; YU, Y.; LI, Z.; ZHANG, L.; SU, S.; LIANG, S. Quantitative analysis of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma by LC with tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 64, p. 523-30, 2006.

SHIHABI, Z. K. Stacking of weakly cationic compounds by acetonitrile for capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 817, p. 25-30, 1998.

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

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, p. 270-6, 2004.

SILVA, J. A. S.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, p. 740-4, 2007.

SOUPPART, C.; GAUDUCHEAU, N.; SANDRENAN, N.; RICHARD, F. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 774, p. 195-203, 2002.

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

STALCUP, A. M.; AGYEL, N. M. Heparin: a chiral mobile-phase additive for capillary zone electrophoresis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 66, p. 3054-9, 1994.

SWARTZ, M. E. UPLC: an introduction and review. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v. 28, p. 1253-63, 2005.

TAGOE, C. N. B.; OFORI-ADJEI, D. Effects of chloroquine and its enantiomers on the development of rat embryos in vitro. **Teratology**, New York, v. 52, p. 137-42, 1995.

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

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 19, p. 173-81, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 20, p. 493-511, 1997.

TAYLOR, R. B.; TOASAKSIRI, S.; REID, R. G. A literature assessment of sample pretreatments and limits of detection for capillary electrophoresis of drugs in biological fluids and practical investigation with some antimalarials in plasma. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 2791-7, 1998.

THOMAS, C. G.; WARD, S. A.; EDWARDS, G. Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 583, p. 131-6, 1992.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v. 28, p. 1215-31, 2005.

THORMANN, W. Progress of capillary electrophoresis in therapeutic drug monitoring and clinical and forensic toxicology. **Ther. Drug. Monit.**, New York, v. 24, p. 222-31, 2002.

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

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

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

VAN AGTMAEL, M. A.; BUTTER, J. J.; PORTIER, E. J. G.; VAN BOXTEL, C. J. Validation of an improved reversed-phase high-performance liquid chromatography assay with reductive electrochemical detection for the determination of artemisin derivatives in man. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 20, p. 109-16, 1998.

VAN AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; VAN BOXTEL, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 20, p. 199-205, 1999.

VERLEYSEN, K.; SANDRA, P. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 2798-833, 1998.

VESPALEC, R.; BOČEK, P. Chiral separations in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 2579-91, 1999.

VOGESER, M.; SEGER, C. A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory - goals for further developments. **Clin. Biochem.**, Oxford, v. 41, p. 649-62, 2008.

WALKER, O.; ADEMOWO, O. G. A rapid, cost-effective liquid chromatographic method for the determination of chloroquine and desethylchloroquine in biological fluids. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 18, p. 92-6, 1996.

WALLÉN, L.; ERICSSON, O.; WIKSTRÖM, I.; HELLGREN, U. High-performance liquid chromatographic system for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma and urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 655, p. 153-7, 1994.

WÄTZIG, H.; DEGENHARDT, M.; KUNKEL, A. Strategies for capillary electrophoresis: method development and validation for pharmaceutical and biological applications. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 2695-752, 1998.

WHITE, N. J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. **Science**, Washington, v. 320, p. 330-4, 2008.

WISTUBA, D.; SCHURIG, V. Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 875, p. 255-76, 2000.

WOZNIACKA, A.; McCAULIFFE, D. P. Optimal use of antimalarials in treating cutaneous lupus erythematosus. **Am. J. Clin. Dermatol.**, Auckland, v. 6, n. 1, 1-11, 2005.

ANEXO A

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 06.1.907.53.4), intitulado:
"Análise de Fármacos Antimaláricos em Plasma: Contribuições de técnicas atuais de análise e de preparação de amostras", de autoria de **Igor Rafael dos Santos Magalhães**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 03.10.06.

Ribeirão Preto, 5 de outubro de 2006

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro