



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Avaliação da Cromatografia Líquida de Alta  
Eficiência e Eletroforese Capilar no Estudo *in vitro* do  
Metabolismo Enantiosseletivo da Hidroxicloroquina**

Carmem Dickow Cardoso

Tese apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2006

Carmem Dickow Cardoso

**Avaliação da Cromatografia Líquida de Alta  
Eficiência e Eletroforese Capilar no Estudo *in vitro* do  
Metabolismo Enantiosseletivo da Hidroxicloroquina**

Tese apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área: **Química**.

Área de concentração: Química

Orientador: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

RIBEIRÃO PRETO - SP

2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Campus Administrativo

De Ribeirão Preto/USP

Cardoso, Carmem Dickow

Avaliação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar no Estudo *in vitro* do Metabolismo Enantiosseletivo da Hidroxicloroquina

112 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Química

Orientador: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

1. Hidroxicloroquina.
2. Análise Enantiosseletiva.
3. Metabolismo *in vitro*

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**

Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Carmem Dickow Cardoso, apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai Cirilo (in memorian) e ao meu sobrinho Alexandre (in memorian), amados do meu coração. Muita saudade...*

## AGRADECIMENTOS

Ao Maravilhoso Deus, meu sustento emocional e espiritual nessa fase ao mesmo tempo tão cheia de alegrias e lutas. “Tudo foi criado por meio dEle e para Ele. Ele é antes de todas as coisas. Nele tudo subsiste”. Colossenses 1: 16b e 17

A minha grande e inigualável família, representada pela figura forte e doce de minha “mamy” e amiga, Ione.

À Universidade Católica de Pelotas/RS por proporcionar-me a oportunidade de crescimento profissional, permitindo meu afastamento das atividades docentes e pelo suporte financeiro nesse período. Especialmente à Profa. Dra. Iraci Pacholski e ao Prof. Dr. William Peres, que empenharam-se para que esse doutorado fosse realidade.

À Dra. Pierina, orientadora, professora e amiga. Faltam palavras para agradecer o quanto você foi competente, compreensiva e generosa, indo muito além de uma orientação profissional. Obrigado, do fundo do meu coração, pela oportunidade, pelo carinho e por ter-me recebido no CROEC.

Aos amigos, colegas, professores e funcionários do CROEC e do laboratório de Química Analítica/Química Geral e Inorgânica por sua receptividade e por terem sido minha “família paulista”.

À Lâmia, tão eficiente na secretaria da PGQ e sempre disposta a prestar-me ajuda, desde quando eu ainda estava no sul.

Aos pastores, irmãos em Cristo e amigos da Comunidade Cristã de Ribeirão Preto e à Dona Diza. Vocês foram fundamentais na minha vida, em Ribeirão.

Aos integrantes do laboratório de Bioquímica e do Biotério da FCFRP - USP pelo auxílio técnico e pela disponibilidade em ajudar, sempre.

Ao Prof. Dr. Gil Valdo por sua compreensão nas minhas idas e vindas ao sul, durante a disciplina de Estereoquímica.

Ao Mateus, meu amigo gaúcho, que se dispôs a ajudar-me na formatação final da tese, mesmo na “carrera”.

### ***RESUMO***

A hidroxicloroquina (HCQ) é um importante fármaco quiral usado, principalmente, no tratamento de artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e malária e cujas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas são estereosseletivas. Em relação às propriedades farmacocinéticas, alguns estudos prévios indicam que o metabolismo estereosseletivo parece ser função da espécie estudada, o que implica na necessidade de métodos seletivos para a determinação de seus enantiômeros em materiais biológicos. Assim, propôs-se o desenvolvimento e a validação de métodos para análise dos enantiômeros do fármaco inalterado e de seus principais metabólitos em frações microsossomais de homogeneizados de fígado de ratos e camundongos. Para tanto foram empregadas as técnicas de eletroforese capilar (CE) e de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Inicialmente foi desenvolvido um método por HPLC, em uma etapa, para a quantificação dos enantiômeros de dois metabólitos da HCQ, desetilcloroquina (DCQ) e desetilhidroxicloroquina (DHCQ) em microsossomas de fígado de ratos e camundongos. A separação foi efetuada utilizando-se a coluna Chiralpak AD-RH e hexano:isopropanol (92:8, v/v) acrescido de 0,1% de dietilamina como fase móvel. O procedimento de extração líquido-líquido foi utilizado para a preparação das amostras. A metodologia desenvolvida resultou na completa resolução dos enantiômeros da HCQ, DCQ e DHCQ e pode ser considerada adequada, visto que os parâmetros de validação mostraram valores dentro dos limites exigidos na literatura. O segundo método desenvolvido permitiu a quantificação dos enantiômeros dos três metabólitos da HCQ: DCQ, DHCQ e bisdesetilcloroquina (BDCQ) em microsossomas de fígado de camundongos. A separação foi efetuada utilizando-se um tubo capilar de sílica fundida

## Resumo

---

e solução do eletrólito tris(hidroximetil)aminometano  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , ajustada a pH 9,0 com ácido fosfórico e acrescida de 1% (m/v) de  $\beta$ -CD - sulfatada e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD - hidroxipropilada. O procedimento de extração líquido-líquido foi eficiente para remover interferentes e os parâmetros de validação mostraram valores dentro dos limites exigidos na literatura. Os métodos desenvolvidos foram aplicados no estudo *in vitro* do metabolismo da HCQ em frações microsossomais de fígado dos animais, verificando-se que o principal metabólito formado é o (-)-(R)-DHCQ, para ambas espécies estudadas.



## Abstract

---

### ***ABSTRACT***

Hydroxychloroquine (HCQ) is an important chiral drug used specially in the treatment of rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and malaria, with stereoselective pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Concerning these properties, some previous studies indicate that the stereoselective metabolism seems to be a function of the studied species, therefore selective methods are required for the determination of its enantiomers in biological matrix. Thus, the present work reports the development and validation of methods for the analysis of the enantiomers of HCQ and its main metabolites in microsomal fraction of rats and mice liver homogenates. Capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used for this purpose. Initially, a one-step HPLC method was developed for the quantification of the enantiomers of two HCQ metabolites, desethylchloroquine (DCQ) and desethylhydroxychloroquine (DHCQ) in microsomal fraction of rats and mice liver homogenates. The separation was performed on a Chiralpak AD-RH column using hexane:isopropanol (92:8, v/v) plus 0.1% diethylamine as the mobile phase. Liquid-liquid extraction procedure was used for sample preparation. The developed methodology resulted in the complete resolution of HCQ, DCQ and DHCQ enantiomers and can be considered suitable because the validation parameters are in accordance with the limits established in the literature. The second developed method allowed the quantification of the enantiomers of the three HCQ metabolites, DCQ, DHCQ and bisdesethylchloroquine (BDCQ) in microsomal fraction of mice liver homogenates. The separation was performed using a fused-silica capillary tube and tris (hydroxymethyl) aminometane 100 mmol L<sup>-1</sup> electrolyte solution, adjusted at pH 9.0 with phosphoric acid, containing 1%

## Abstract

---

(w/v) sulfated-  $\beta$  -CD and 30 mmol L<sup>-1</sup> hydroxypropyl-  $\beta$  -CD. The liquid-liquid extraction procedure was efficient to remove interferents and the validation parameters showed values within accordance to the literature. The developed methods were applied in the *in vitro* metabolism study of HCQ in microsomal fractions of the liver of the animals and it was verified that the main metabolite formed is (-)-(R)-DHCQ for both animal species studied.

### **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1: Esquema do desenvolvimento do EOF (adaptado de HEIGER, 1992a). \_\_9
- Figura 2: Perfil do fluxo em CE (a) e em HPLC (b) (adaptado de HEIGER, 1992a). \_\_\_\_\_ 10
- Figura 3: Esquema de um equipamento para CE. \_\_\_\_\_ 12
- Figura 4: Estrutura de uma CD. \_\_\_\_\_ 14
- Figura 5: HCQ e seus metabólitos \_\_\_\_\_ 16
- Figura 6: Procedimento de preparação das amostras para análise por HPLC \_\_\_\_29
- Figura 7: Procedimento para preparação das amostras para análise por CE \_\_\_\_42
- Figura 8: Procedimento para isolamento da fração microssomal de homogeneizado de fígado \_\_\_\_\_50
- Figura 9: Cromatograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos DCQ e DHCQ na coluna Chiralpak AD: (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-DHCQ (3), (+)-(S)-DHCQ (4) e *rac*-BDCQ (5). Condições cromatográficas: Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm, partículas de 10 µm); hexano:metanol (96:4, v/v) com 0,4% de DEA como fase móvel (vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>) e detecção em 343 nm. \_\_\_\_\_57
- Figura 10: Cromatograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos DCQ e DHCQ na coluna Chiralpak AD-RH: (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-HCQ (3) e (+)-(S)-HCQ (4), (-)-(R)-DHCQ (5), (+)-(S)-DHCQ (6) e *rac*-BDCQ (7). Condições cromatográficas: Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm); hexano:isopropanol (92:8, v/v) com 0,1% de DEA como fase móvel (vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>) e detecção em 343 nm. \_\_\_\_\_58
- Figura 11: Curvas analíticas para os enantiômeros do metabólito DCQ, no intervalo de concentração plasmática de 50 – 5000 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_62
- Figura 12: Curvas analíticas para os enantiômeros do metabólito DHCQ, no intervalo de concentração plasmática de 125 – 2500 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_62
- Figura 13: Eletroferograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos em plasma diluído, fortificado com 2000 ng mL<sup>-1</sup> dos enantiômeros: (-)-

## Lista de Figuras

---

- (*R*)-HCQ (1) e (+)-(*S*)-HCQ (2), (-)-(*R*)-DHCQ (3) e (+)-(*S*)-DHCQ (4), (+)-(*S*)-DCQ (5), (-)-(*R*)-BDCQ (6), (-)-(*R*)-DCQ (7) e (+)-(*S*)-BDCQ (8). \_77
- Figura 14: Curva analítica para os enantiômeros da HCQ, no intervalo de concentração de 625 – 10000 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 80
- Figura 15: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito DHCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 80
- Figura 16: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito DCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 81
- Figura 17: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito BDCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 81
- Figura 18: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função do tempo de incubação. \_\_\_\_\_ 86
- Figura 19: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função do tempo de incubação. \_\_\_\_\_ 87
- Figura 20: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função da concentração de HCQ. \_\_\_\_\_ 88
- Figura 21: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função da concentração de HCQ. \_\_\_\_\_ 88
- Figura 22: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função do volume da fração microssomal. \_\_\_\_\_ 89
- Figura 23: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função do volume da fração microssomal. \_\_\_\_\_ 90
- Figura 24: Cromatogramas de (A) branco da fração microssomal de fígado de rato, (B) incubação da fração microssomal de fígado de ratos com *rac*-HCQ e (C) incubação da fração microssomal de fígado de camundongos. (-)-(*R*)-DCQ (1) e (+)-(*S*)-DCQ (2), (-)-(*R*)-DHCQ (3) e (+)-(*S*)-DHCQ (4). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas na legenda da Figura 10. \_\_\_\_\_ 96
- Figura 25: Eletroferogramas (A) de branco da fração microssomal e (B) da fração microssomal incubada com *rac*-HCQ: (1) (-)-(*R*)-HCQ, (2) (+)-(*S*)-HCQ,

## Lista de Figuras

---

(3) (-)-(R)-DHCQ, (4) (+)-(S)-DHCQ, (5) (+)-(S)-DCQ, (6) (-)-(R)-BDCQ,  
(7) (-)-(R)-DCQ, (8) (+)-(S)-BDCQ \_\_\_\_\_ 98

## Lista de Tabelas

---

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1:	Preparo das amostras de plasma fortificadas _____	32
Tabela 2:	Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 50 cm x 75 $\mu\text{m}$ _____	38
Tabela 3:	Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 37 cm x 75 $\mu\text{m}$ . _____	39
Tabela 4:	Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 37 cm x 75 $\mu\text{m}$ _____	40
Tabela 5:	Avaliação da linearidade do método desenvolvido _____	44
Tabela 6:	Esquema do preparo das amostras fortificadas empregadas no estudo da precisão e exatidão _____	46
Tabela 7:	Esquema do preparo das amostras fortificadas empregadas na avaliação do limite de quantificação _____	47
Tabela 8:	Condições otimizadas para o estudo <i>in vitro</i> de metabolismo _____	52
Tabela 9:	Procedimento para a dosagem de proteínas _____	54
Tabela 10:	Recuperação do método para a análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ. _____	63
Tabela 11:	Precisão e exatidão na análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ _____	65
Tabela 12:	Limite de quantificação para a análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ _____	66
Tabela 13:	Recuperação do método para análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos DHCQ, DCQ e BDCQ. _____	82
Tabela 14:	Precisão e exatidão intra-ensaio ( $n=5$ ) na análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos. _____	83
Tabela 15:	Precisão e exatidão interensaios ( $n=3$ dias) na análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos. _____	84

## Lista de Tabelas

---

Tabela 16:	Limite de quantificação para a análise dos enantiômeros dos metabólitos da HCQ. _____	85
Tabela 17:	Concentrações médias de cada enantiômero produzido nas três etapas de otimização. _____	91
Tabela 18:	Concentrações médias de cada enantiômero nas duas condições de anestesia. _____	92
Tabela 19:	Concentrações médias de cada enantiômero no experimento que avalia o efeito do indutor de metabolismo. _____	93
Tabela 20:	Concentrações médias de cada enantiômero no experimento que compara o metabolismo em frações microsomal e mitocondrial. _____	95
Tabela 21:	Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de ratos. _____	97
Tabela 22:	Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de camundongos. _____	97
Tabela 23:	Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de camundongos. _____	99

## Lista de Abreviaturas

---

### ***LISTA DE ABREVIATURAS***

AGP	glicoproteína ácida (do inglês, Acid Glycoprotein)
BSA	soroalbumina bovina (do inglês, Bovine Serum Albumin)
BDCQ	bisdesetilcloroquina
CDs	ciclodextrinas
CE	Eletroforese capilar (do inglês, Capillary Electrophoresis)
CM- $\beta$ -CD	beta ciclodextrina carboximetilada
CQ	cloroquina
CSP	fase estacionária quiral (do inglês, Chiral Stationary Phase)
CV	desvio padrão relativo
CYP450	citocromo P450
DCQ	desetilcloroquina
DHCQ	desetilhidroxicloroquina
E	erro relativo
EGTA	ácido etilenoglicotetracético (do inglês, Ethyleneglycotetracetic acid)
EOF	fluxo eletrosmótico (do inglês, Electroosmotic flow)
FDA	Foods and Drugs Administration
HBA	soro albumina humana (do inglês, Human Serum Albumin)
HCQ	hidroxicloroquina
HP- $\beta$ -CD	beta ciclodextrina hidroxipropilada
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High-Performance Liquid Chromatography)
i. p.	intra-peritonal



## Lista de Abreviaturas

---

LES	lupus eritematoso sistêmico
n	número de determinações
NADP	nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato (do inglês, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NRS	solução de incubação (do inglês, NADPH regenerating system)
OVM	ovomucóide
rac	racêmico
S- $\beta$ -CD	beta ciclodextrina sulfatada
UV-Vis	ultra-violeta/visível

## **SUMÁRIO**

### **LISTA DE FIGURAS**

### **LISTA DE TABELAS**

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fármacos quirais</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Resolução de enantiômeros</b>	<b>3</b>
1.2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	3
1.2.2. ELETROFORESE CAPILAR	7
1.2.2.1. Princípio da separação	7
1.2.2.2. Instrumentação	11
1.2.2.3. Separação de enantiômeros por CE	13
<b>1.3. Hidroxicloroquina</b>	<b>15</b>
1.3.1. PROPRIEDADES ESTEREOSSELETIVAS DA HIDROXICLOROQUINA	15
1.3.2. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA HIDROXICLOROQUINA	19
<b>1.4. Estudo de metabolismo in vitro</b>	<b>20</b>
<b>2 - OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Separação por HPLC</b>	<b>26</b>
3.1.1. EQUIPAMENTOS	26
3.1.2. SOLVENTES E REAGENTES	26
3.1.3. SOLUÇÕES-PADRÃO	27
3.1.4. COLUNAS QUIRAIS	27
3.1.5. AMOSTRAS DE PLASMA	28

## Sumário

---

3.1.6.	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA _____	28
3.1.7.	CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA _____	29
3.1.8.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO _____	30
3.1.8.1.	Calibração e linearidade _____	30
3.1.8.2.	Recuperação _____	31
3.1.8.3.	Precisão e Exatidão _____	32
3.1.8.4.	Limite de quantificação _____	34
3.1.9.	ORDEM DE ELUIÇÃO _____	34
<b>3.2.</b>	<b>Separação por CE _____</b>	<b>35</b>
3.2.1.	EQUIPAMENTOS _____	35
3.2.2.	SOLVENTES E REAGENTES _____	36
3.2.3.	SOLUÇÕES-PADRÃO _____	36
3.2.4.	CAPILARES _____	37
3.2.4.1.	Condicionamento de capilares novos _____	37
3.2.4.2.	Armazenamento dos capilares _____	37
3.2.5.	SOLUÇÕES DE ELETRÓLITOS _____	38
3.2.6.	AMOSTRAS DE PLASMA E DE FRAÇÕES MICROSSOMAS _____	41
3.2.7.	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA _____	41
3.2.8.	CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A ANÁLISE ELETROFORÉTICA _____	42
3.2.9.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO _____	43
3.2.9.1.	Calibração e linearidade _____	43
3.2.9.2.	Recuperação _____	44
3.2.9.3.	Precisão e Exatidão _____	45
3.2.9.4.	Limite de quantificação _____	47
<b>3.3.</b>	<b>Estudo de metabolismo _____</b>	<b>47</b>
3.3.1.	EQUIPAMENTOS _____	47

## Sumário

---

3.3.2.	SOLVENTES E REAGENTES _____	48
3.3.3.	ANIMAIS _____	48
3.3.4.	PROCEDIMENTO DE INCUBAÇÃO _____	49
3.3.4.1.	Isolamento das frações microssomais de homogeneizado de fígado _____	49
3.3.4.2.	Otimização das condições de incubação _____	51
3.3.4.3.	Incubação com fração mitocondrial de homogeneizado de fígado _____	53
3.3.5.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS _____	54
<b>3.4.</b>	<b>Aplicação dos métodos _____</b>	<b>55</b>
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO _____</b>		<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>Otimização da separação por HPLC _____</b>	<b>56</b>
4.1.1.	RESOLUÇÃO QUIRAL _____	56
4.1.2.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS _____	59
4.1.3.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO _____	60
4.1.3.1.	Calibração e linearidade _____	61
4.1.3.2.	Recuperação _____	62
4.1.3.3.	Precisão e exatidão _____	64
4.1.3.4.	Limite de quantificação _____	65
4.1.4.	ORDEM DE ELUIÇÃO _____	66
<b>4.2.</b>	<b>Otimização da separação por CE _____</b>	<b>67</b>
4.2.1.	DIMENSÕES DO CAPILAR _____	68
4.2.2.	CONDICIONAMENTO DO CAPILAR _____	69
4.2.3.	CONDIÇÕES DE INJEÇÃO _____	70
4.2.4.	COMPOSIÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PH DA SOLUÇÃO DE ELETRÓLITOS _____	70
4.2.5.	SELETOR QUIRAL _____	72
4.2.6.	VOLTAGEM APLICADA _____	74

## Sumário

---

4.2.7.	TEMPERATURA _____	74
4.2.8.	SOLUÇÃO DE DISSOLUÇÃO _____	75
4.2.9.	CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO OTIMIZADAS E ORDEM DE MIGRAÇÃO ____	76
4.2.10.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS _____	78
4.2.11.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO _____	79
4.2.11.1.	Calibração e linearidade _____	79
4.2.11.2.	Recuperação _____	82
4.2.11.3.	Precisão e exatidão _____	83
4.2.11.4.	Limite de quantificação _____	84
<b>4.3.</b>	<b>Otimização do estudo in vitro de metabolismo e aplicação dos métodos _____</b>	<b>85</b>
4.3.1.	CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO _____	86
4.3.1.1.	Tempo de incubação _____	86
4.3.1.2.	Concentração de HCQ racêmica _____	87
4.3.1.3.	Volume da fração microssomal _____	89
4.3.1.4.	Outros testes de otimização _____	92
4.3.2.	INCUBAÇÃO COM FRAÇÃO MITOCONDRIAL DE HOMOGENEIZADO DE FÍGADO _____	94
4.3.3.	APLICAÇÃO DOS MÉTODOS _____	95
<b>5 - CONCLUSÕES _____</b>		<b>100</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>		<b>102</b>

---

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1. *Fármacos quirais*

Cerca de vinte e cinco por cento dos agentes terapêuticos são obtidos por vias sintéticas e administrados ao homem como misturas racêmicas. Entretanto, as propriedades farmacocinéticas dos enantiômeros podem diferir em razão da enantiosseletividade em um ou mais dos processos de absorção, distribuição, metabolismo ou excreção do fármaco. A importância da estereoquímica na disposição cinética de fármacos quirais depende do mecanismo do processo em questão: processos passivos, tais como difusão pelas membranas, não envolvem interações macromoleculares e a estereoquímica tem pouca influência, mas quando o fármaco interage com uma enzima ou com um sistema transportador, a discriminação é observada [CALDWELL, 1995; CALDWELL, 1996].

As diferentes interações com componentes biológicos também podem resultar em diferentes efeitos farmacológicos, o que se denomina propriedades farmacodinâmicas. O uso de misturas racêmicas pode contribuir para a toxicidade ou efeitos adversos do fármaco, particularmente quando estes estão associados com isômeros farmacologicamente menos ativos ou inativos [CALDWELL, 1995; CALDWELL, 1996]. Cita-se a talidomida como o exemplo mais conhecido dos riscos da administração de um fármaco quiral em sua forma racêmica. No início da década de 60 a talidomida racêmica foi intensamente prescrita para gestantes, como sedativo e agente anti-náuseas, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com

---

deformações congênitas. Atribuiu-se as propriedades sedativas ao (+)-(R)-enantiômero, enquanto que as propriedades teratogênicas foram relacionadas com o (-)-(S)-enantiômero. Porém, a administração da forma enantiomericamente pura (+)-(R)-talidomida não teria evitado os efeitos teratogênicos, pois estudos posteriores mostraram que a talidomida sofre racemização *in vivo* [LIMA et al, 2001].

O interesse na quiralidade e nas suas conseqüências não é um fenômeno recente. Porém, durante a última década, por razões econômicas e científicas, o interesse acerca desse fenômeno aumentou e a indústria farmacêutica foi a principal incentivadora e contribuinte nesse processo [MAIER et al, 2001]; a questão da quiralidade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos, já que o uso de fármacos quirais enantiomericamente puros pode ser vantajoso por possibilitar, entre outros: redução na dose administrada, simplificação na relação dose-resposta, redução na toxicidade devido ao isômero inativo [CALDWELL, 1995].

Adicionalmente, as autoridades governamentais que regularizam a produção e distribuição de medicamentos, como por exemplo o “Food and Drug Administration” (FDA) nos Estados Unidos, enfatizam a necessidade de se ter informações sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais e também recomendam a produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros.

Por outro lado, fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados no sentido de avaliar suas propriedades cinéticas e

---

dinâmicas estereosseletivas e verificar se existem vantagens na produção como enantiômero puro.

Todos esses dados apresentados acima foram um forte estímulo para o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco, seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas são, obviamente, um pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e controlar a qualidade, respectivamente. As principais técnicas analíticas capazes de fornecer essas informações são baseadas na ciência da separação [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998].

## **1.2. Resolução de enantiômeros**

### **1.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência**

A maioria dos estudos de separação enantiomérica, até então, têm sido desenvolvidos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês high-performance liquid chromatography) [FRIED & WAINER, 1997; TACHIBANA & OHNISHI, 2001]. Existem três procedimentos que podem ser utilizados para a separação de enantiômeros empregando essa técnica: derivação quiral, adição de aditivo quiral à fase móvel e emprego da fase estacionária quiral.

A derivação quiral envolve a reação da mistura de enantiômeros com um agente derivatizante quiral, enantiomericamente puro, para formar dois derivados



---

diastereoisoméricos. Os diastereoisômeros podem, então, ser separados usando HPLC no modo de eluição fase reversa ou fase normal.

No segundo procedimento, um seletor quiral é adicionado à fase móvel. Os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o analito e a fase móvel, acrescida do seletor quiral, também podem ser separados por HPLC no modo de eluição fase reversa ou fase normal.

O chamado método direto utiliza um seletor quiral quimicamente ligado ou recobrimo um suporte sólido, para formar a chamada fase estacionária quiral (CSP, do inglês *chiral stationary phase*). A habilidade da CSP em interagir com os dois enantiômeros do analito para formar complexos diastereoisoméricos transitórios utilizando ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , complexos de inclusão e impedimento estereo é a força motriz por detrás da enantioseparação. A força de ligação relativa desses complexos diastereoisoméricos determina a enantiosseletividade; um enantiômero será ligado mais fortemente a CSP que o outro [SNYDER et al, 1997]. Este é o procedimento com maior aplicabilidade nas separações enantioméricas.

O desenvolvimento de uma CSP capaz de reconhecimento quiral efetivo de um grande número de enantiômeros é o ponto-chave da técnica de HPLC quiral. Existem mais de 100 tipos diferentes de CSPs disponíveis comercialmente [YASHIMA, 2001], destacando-se as fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos e proteínas, empregadas nesse estudo.

As colunas baseadas em CSPs derivadas de polissacarídeos estão entre as mais usadas na resolução e na quantificação de compostos quirais em fluídos

---

biológicos, devido a sua eficiência, versatilidade e estabilidade [OKAMOTO & KAIDA, 1994; YASHIMA, 2001].

Polissacarídeos como a celulose e a amilose são os polímeros com atividade óptica encontrados mais abundantemente na natureza. Apesar de naturalmente apresentarem reconhecimento quiral, a derivação desses polímeros produz CSPs com maior capacidade de separação quiral [OKAMOTO & KAIDA, 1994].

Derivados de polissacarídeos, particularmente ésteres de celulose e derivados fenilcarbamato de celulose e amilose são CSPs bastante efetivas e podem resolver um grande número de racematos. Os mais importantes sítios para a discriminação quiral nos derivados de carbamatos são, provavelmente, os grupos carbamato polares, os quais podem interagir com os enantiômeros via ligação de hidrogênio com NH e C=O e por interação dipolo-dipolo com o grupo C=O. Nos derivados de acetato e benzoato, considera-se o grupo carbonila polar como sítio de interação com o racemato, via ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo [YASHIMA & OKAMOTO, 1995]. Para obter CSPs mais eficientes e resistentes, esses derivados são incorporados em um suporte de sílica funcionalizada com grupos amino propil.

Os modos de eluição comumente usados em separações com essas CSPs são o modo de eluição em fase normal e o modo de eluição em fase reversa. O primeiro utiliza misturas de alcanos e álcoois e o segundo, misturas de álcool ou acetonitrila com uma fase aquosa que pode ser água ou uma solução tampão, caso o pH necessite ser ajustado. Há um outro modo de eluição no qual solventes orgânicos polares puros são usados. Esse modo de eluição chama-se modo polar orgânico e os solventes

---

tipicamente usados com as CSPs baseadas em polissacarídeos são acetonitrila, metanol, etanol, propanol puros ou suas misturas [TACHIBANA & OHNISHI, 2001].

CSPs baseadas em proteínas também apresentam interesse devido a suas propriedades enantiosseletivas e por serem capazes de separar um grande número de compostos quirais. Podem ser preparadas a partir da proteína fisicamente adsorvida ou ligada covalentemente ao suporte (sílica-gel, agarose, polímeros). Nas fases cujas proteínas são ligadas covalentemente ao suporte, a ligação se dá pelos grupamentos amina e carboxila da proteína [HAGINAKA, 2001].

Estas fases exibem uma ampla enantiosseletividade provavelmente devido às múltiplas possibilidades de interações moleculares entre os compostos quirais e a superfície da proteína. Dentre as CSPs mais utilizadas, estão as fases baseadas em soro albuminas, bovina (BSA – do inglês bovine serum albumin) e humana (HBA – do inglês human serum albumin), glicoproteínas e proteínas ovomucóide [MILLOT, 2003].

As fases HBA e BSA apresentam grande semelhança e, conseqüentemente, as características de suas ligações estereosseletivas são similares [HAGINAKA, 2001]. A fase  $\alpha_1$  glicoproteína ácida (AGP – do inglês acid glycoprotein) é a mais utilizada dentre as CSPs proteicas e é disponível comercialmente com duas formas diferentes de imobilização da proteína sobre o suporte, o que produz diferente desempenho das mesmas. A proteína ovomucóide (OVM) sofre fortes interações hidrofóbicas com solutos aromáticos hidrofóbicos e a quantidade de proteína imobilizada sobre o suporte aparentemente influencia o grau de resolução [SNYDER et al, 1997].

### 1.2.2. *Eletroforese Capilar*

A eletroforese capilar (CE, do inglês capillary electrophoresis) tem recebido especial atenção para a separação de enantiômeros e é cada vez mais considerada uma importante técnica complementar às técnicas de HPLC, cromatografia com fluido supercrítico (SFC, do inglês supercritical fluid chromatography) e cromatografia gasosa capilar (CGC, do inglês capillary gas chromatography) [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998].

Algumas das principais características da CE são a alta eficiência, tempo curto de análise, utilização de volumes bastante reduzidos de amostra (1-10 nL), reduzido custo de operação e simplicidade na instrumentação [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998; TAVARES, 1996]. Outra grande vantagem da técnica é a diversidade na sua aplicação. Considerada originalmente para a análise de macromoléculas biológicas, tem sido útil para separação de inúmeros outros compostos tais como aminoácidos, fármacos, vitaminas, pesticidas, íons inorgânicos, peptídeos e carboidratos [HEIGER, 1992a].

#### 1.2.2.1. *Princípio da separação*

Na CE, as separações são realizadas em um tubo capilar de sílica fundida (sem coluna e solvente orgânico especiais), preenchido com uma solução de eletrólitos. No caso de separações quirais essa solução de eletrólitos é adicionada de um ou mais seletores quirais [TAVARES, 1996].

A separação baseia-se na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, sob um campo elétrico. As diferentes mobilidades dos solutos favorecem a seletividade do método. Essa mobilidade, chamada mobilidade eletroforética,  $\mu_e$ , e

---

expressa pela Equação 1, depende da carga do soluto, do seu tamanho e da viscosidade do meio. Assim, conclui-se que espécies pequenas, com maior carga terão maior mobilidade em relação às espécies maiores, pouco carregadas [ALTRIA, 1996].

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

onde: q = carga do íon

$\eta$  = viscosidade da solução

r = raio do íon

O movimento das espécies no capilar depende do também do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês electroosmotic flow). O EOF é um constituinte fundamental da técnica de CE. Consiste do fluxo de líquido dentro do capilar e é consequência da carga na superfície interna da parede do capilar. Sob condições aquosas, a maioria das superfícies sólidas possui um excesso de cargas negativas, que pode resultar da ionização da superfície ou da adsorção de espécies iônicas à superfície. Em superfícies de sílica, ambos processos provavelmente ocorrem, embora o EOF seja principalmente controlado pelos grupos silanóis (SiOH) existentes na forma aniônica (SiO<sup>-</sup>) [HEIGER, 1992a]. O desenvolvimento do EOF está esquematizado na Figura 1.

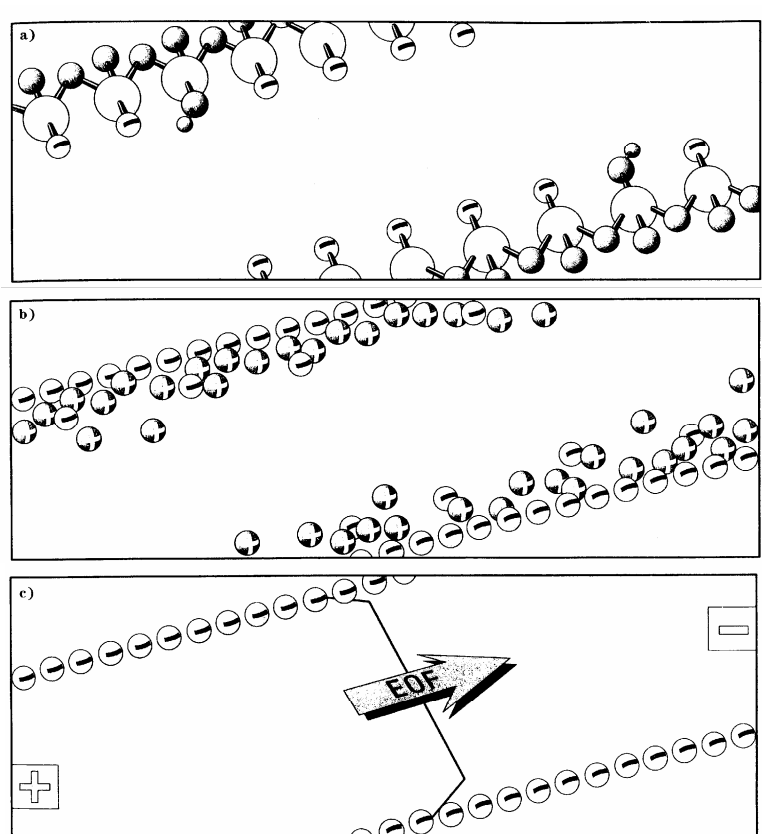


Figura 1: Esquema do desenvolvimento do EOF (adaptado de HEIGER, 1992a).

Uma característica única do EOF no capilar é o perfil plano do fluxo (Figura 2). Em HPLC, o uso de bombas produz um perfil laminar (ou parabólico) do fluxo, o que pode ocasionar o alargamento das bandas. Em CE, a velocidade uniforme das moléculas através do capilar causa menor dispersão da amostra e por isso o fluxo apresenta um perfil plano, otimizando a eficiência do método [HEIGER, 1992a].

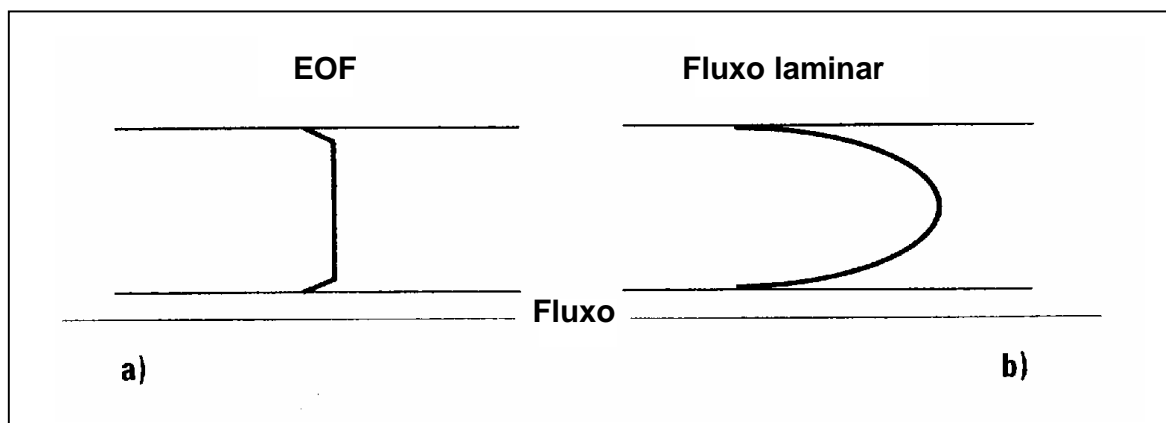


Figura 2: Perfil do fluxo em CE (a) e em HPLC (b) (adaptado de HEIGER, 1992a).

A seletividade da separação pode ser otimizada por alterações nas propriedades da solução tampão, tais como, pH, força iônica, composição da solução ou incorporação de aditivos (surfactantes, solventes orgânicos, agentes de complexação) [HEIGER, 1992a].

A CE pode ser utilizada sob vários mecanismos de separação: eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês capillary zone electrophoresis), cromatografia eletrocinética micelar (MECC, do inglês micellar electrokinetic capillary chromatography), eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês capillary gel electrophoresis), eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF, do inglês capillary isoelectric focusing), isotacoforese capilar (CITP, do inglês capillary isotachopheresis) e eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês capillary electrochromatography) [TAVARES, 1997; HILHORST *et al*, 2001]. A CZE é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados na prática, provavelmente em razão

---

da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais [TAVARES, 1997]. Adiante essa técnica será descrita com mais detalhes.

#### 1.2.2.2. *Instrumentação*

A CE tornou-se popular somente após 1981, quando Jorgenson & Lukas publicaram seu trabalho no qual demonstraram a simplicidade na instrumentação e o alto poder de resolução da CZE [Jorgenson & Lukas apud ISSAQ, 2002]. O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares, eletrodos (geralmente de platina) e um detector apropriado (Figura 3). Os capilares utilizados são, normalmente, de sílica fundida. Este material confere propriedades interessantes aos capilares: dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência a ataques químicos, alta transmitância óptica para um intervalo de 190 a 900 nm, além de ser responsável pelo fenômeno do EOF. Os comprimentos efetivos do capilar (medidos da extremidade inicial até a janela óptica) variam de 50 a 75 cm. O diâmetro interno do capilar pode variar de 10 a 200  $\mu\text{m}$ , sendo que os mais utilizados são de 50 e 75  $\mu\text{m}$ . A fonte de alta tensão, utilizada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, pode ser operada à voltagem constante ou corrente constante, com valores típicos de voltagem de 0 - 50 kV e corrente, de 0 –200  $\mu\text{A}$  [TAVARES, 1996].

A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente. Tubos capilares de sílica fundida são, então, preenchidos com a solução e servem de canal de migração. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução para completar o



contato elétrico. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante [TAVARES, 1996].

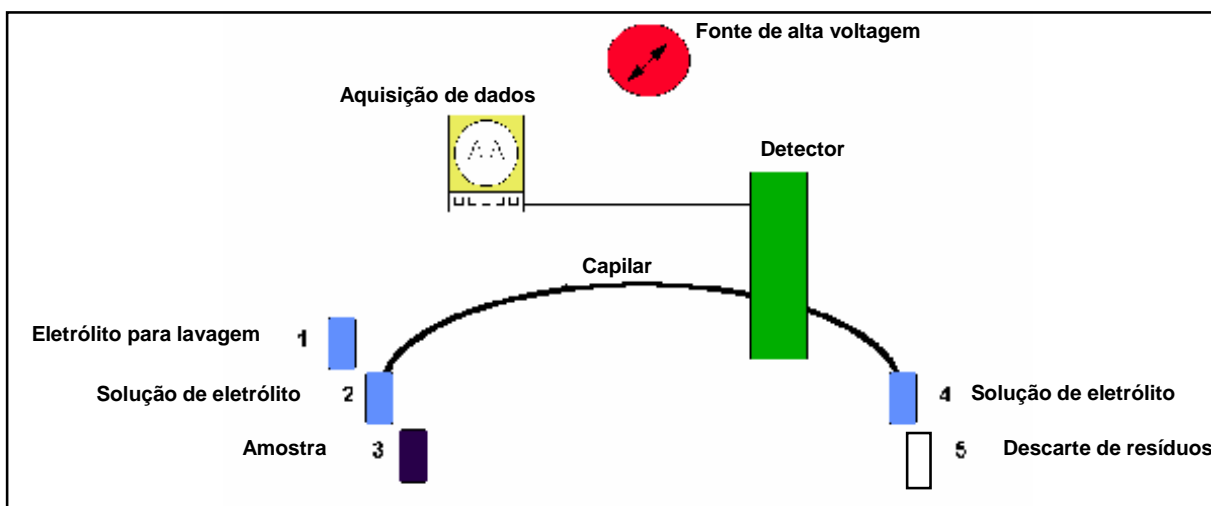


Figura 3: Esquema de um equipamento para CE.

As amostras são introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de CZE e MECK, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de detectabilidade do detector [TAVARES, 1996].

Devido ao pequeno caminho óptico dos capilares, a detectabilidade nas técnicas de CE é relativamente baixa, quando comparada com HPLC, por exemplo. Além disso, o pequeno volume de amostra utilizado também contribui para uma diminuição na detectabilidade [HILHORST *et al*, 2001].

### 1.2.2.3. *Separação de enantiômeros por CE*

CE é uma técnica analítica em crescimento com numerosas vantagens em várias áreas, incluindo separações quirais de fármacos e metabólitos em amostras biológicas. A alta eficiência, característica da técnica, permite a resolução de enantiômeros que apresentam baixo grau de enantiosseletividade. Esta alta eficiência também é importante para prevenir a interferência de compostos presentes na matriz, metabólitos e outros fármacos co-administrados, contribuindo para a seletividade do método [BONATO, 2003].

Dois métodos têm sido empregados com maior frequência em separações quirais: CZE e MECK [ZAUGG & THORMANN, 2000; BONATO, 2003]. Será discutido apenas CZE, que foi o método de separação utilizado neste trabalho.

Em CZE, o tubo capilar é preenchido com uma solução de eletrólitos, geralmente com características tamponantes. Quando a voltagem é aplicada, a separação ocorre devido aos solutos migrarem em zonas, a diferentes velocidades. Devido ao EOF, é possível a separação de solutos catiônicos e aniônicos por CZE. Já os solutos neutros não apresentam mobilidade eletroforética e simplesmente coeluem com o EOF [TAVARES, 1996]. Devido à mesma mobilidade eletroforética dos enantiômeros, um seletor quiral deve ser adicionado à solução tampão. Os enantiômeros interagirão diferentemente com o seletor quiral e diferentes mobilidades, dependentes do tempo, serão obtidas. Solutos carregados podem ser separados usando seletores quirais neutros, enquanto que para a separação de solutos neutros, são necessários seletores quirais carregados [VERLEYSEN & SANDRA, 1998].

Seletores quirais como ciclodextrinas (CDs), éteres coroa, proteínas, oligossacarídeos e antibióticos glicopeptídicos macrocíclicos têm sido empregados demonstrando versatilidade e seletividade [HADLEY *et al*, 2000].

Embora haja uma grande variedade de seletores quirais disponíveis, a maioria das análises utiliza CDs nativas ou modificadas [ZAUGG & THORMANN, 2000]. As ciclodextrinas (Figura 4) são oligossacarídeos cíclicos, cuja cavidade pode alojar uma variedade de compostos, formando complexos de inclusão preferencialmente com um dos enantiômeros. As CDs nativas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , possuem, respectivamente, seis, sete e oito subunidades de glicose. Por razões como custo, disponibilidade e dimensões da cavidade (na qual a maioria das moléculas de soluto pode melhor alojar-se), a  $\beta$ -CD representa 95% de todas as CDs produzidas e consumidas.

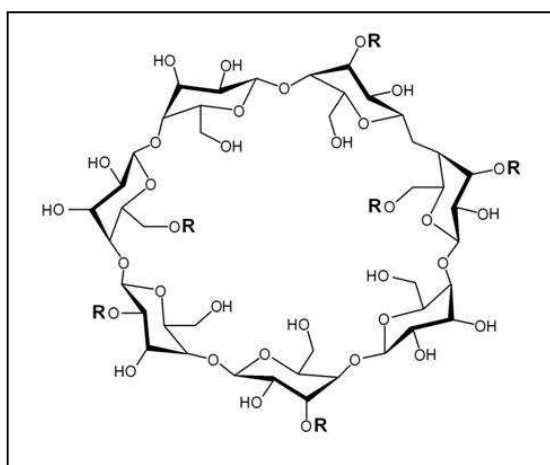


Figura 4: Estrutura de uma CD.

O processo de derivação dos grupos hidroxila da superfície externa da molécula melhora sua capacidade enantiosseletiva pelo ajuste na complexação entre o enantiômero e a CD e melhora também a solubilidade da CD. As modificações podem

---

ser feitas substituindo o átomo de hidrogênio ou o grupo hidroxila por uma variedade de grupos, como: metil, hidroxietil, hidroxipropil, acetil, carboximetil, etc. As CDs mais freqüentemente utilizadas são aquelas derivadas com grupos metil, hidroxietil, hidroxipropil e acetil [BRESSOLLE *et al*, 1996b; BONATO, 2003].

### **1.3. Hidroxicloroquina**

#### **1.3.1. Propriedades estereosseletivas da hidroxicloroquina**

A hidroxicloroquina (HCQ) tem seu uso aprovado pelo FDA (do inglês Foods and Drugs Administration) no tratamento de artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico (LES) e como antimalárico [WOLF *et al*, 2000]. É disponibilizada comercialmente sob a denominação PLAQUENIL (Sanofi Winthrop Pharmaceuticals, New York, NY), uma mistura racêmica (*rac*-HCQ), de dois isômeros, (-)-(R)-HCQ e (+)-(S)-HCQ [IREDALE *et al*, 1993]. Seu metabolismo hepático gera três metabólitos ativos, desetilcloroquina (DCQ), desetilhidroxicloroquina (DHCQ) e bisdesetilcloroquina (BDCQ), todos quirais [DUCHARME *et al*, 1995; WEI *et al*, 1995] (Figura 5).

A HCQ apresenta absorção oral variável com biodisponibilidade de aproximadamente 74% e distribui-se pelo organismo apresentando retenção prolongada nos olhos, fígado e pulmões. A concentração nos eritrócitos é 2 a 5 vezes maior do que a plasmática. A principal via de excreção é a renal, com 23 a 25% do composto excretado em sua forma inalterada, juntamente com os metabólitos [DUCHARME *et al*, 1994].

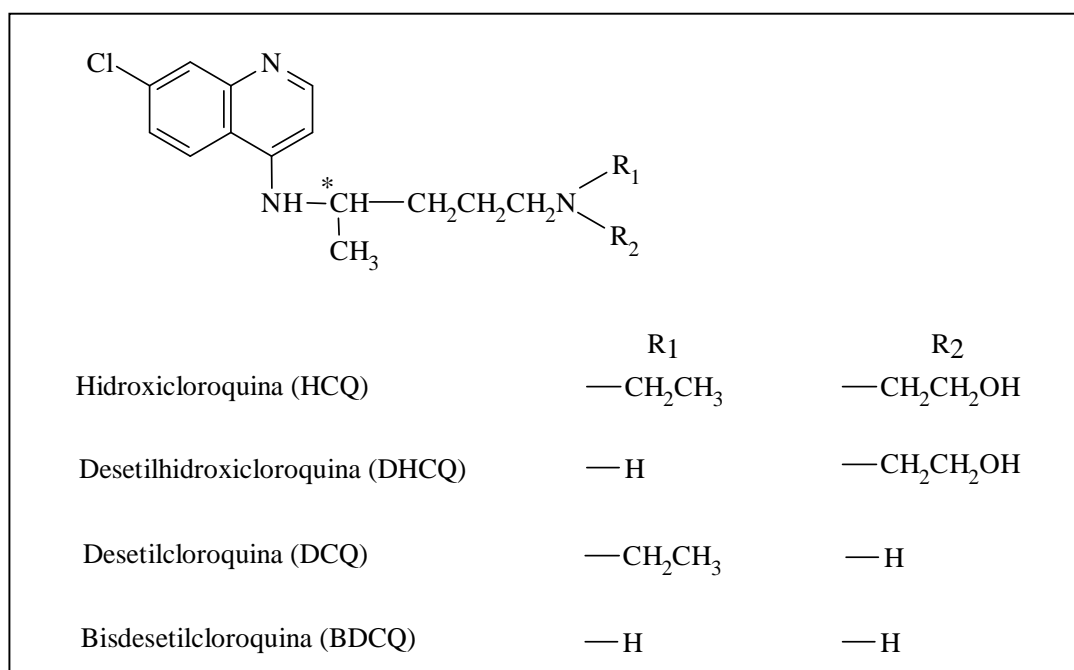


Figura 5: HCQ e seus metabólitos

Congêneres da cloroquina (CQ), a HCQ faz parte de uma grande série de 4-aminoquinolinas investigadas como parte de um extenso programa de pesquisa antimalárica nos EUA, durante a Segunda Guerra Mundial. A partir de 1943, muitos destes compostos foram sintetizados e testados pela sua atividade. Apesar da resistência do parasita (*Plasmodium falciparum*) da malária a esses compostos, principalmente CQ, os mesmos têm provado ser a classe de compostos usada com mais sucesso no tratamento e profilaxia da malária. Ainda, são facilmente sintetizados, com baixo custo de produção e são, geralmente, bem tolerados, com perfil de toxicidade aceitável para tratamento da infecção aguda [O'NEILL *et al*, 1998]. A HCQ é também bastante prescrita para LES, embora pouco se conheça acerca do mecanismo de ação. Sabe-se, no entanto, que previne a progressão da doença e o envolvimento

---

de novos órgãos [PETRI, 1998]. Como anti-reumático, a HCQ atua como imunossupressor leve, inibindo a produção do fator reumatóide e reações agudas. Acumula-se nos glóbulos brancos, estabilizando a membrana lisossômica e inibindo a atividade de várias enzimas, incluindo a protease e a colagenase, responsáveis pela quebra da cartilagem [WOLF *et al*, 2000]. Durante tratamento prolongado da artrite reumatóide, discute-se o risco da HCQ produzir lesão retiniana irreversível. No entanto, o risco de deposição na córnea e toxicidade ocular parece ser menor com a HCQ do que com a CQ nas doses anti-reumáticas convencionais (220 a 400 mg/dia) [HARDMAN *et al*, 1996]. Embora a informação no produto industrializado recomende monitoramento oftalmológico, há uma discussão quanto à real necessidade desse cuidado [CARMICHAEL *et al*, 2003].

As propriedades antiartríticas e antimaláricas dos enantiômeros individuais da HCQ são desconhecidas, embora tenha sido determinado que, em ratos, o (+)-(S)-enantiômero da cloroquina (CQ), estruturalmente similar a HCQ, apresenta maior atividade antimalárica que o (-)-(R)-CQ [BROCKS *et al*, 1992].

A farmacocinética e o metabolismo enantiosseletivos da HCQ também não são totalmente conhecidos [BROCKS & MEHVAR, 2003]. Os estudos sobre disposição cinética da hidroxicloroquina têm sido desenvolvidos *in vivo*, a partir da administração oral do fármaco, em humanos ou animais [BROCKS *et al*, 1992; McLACHLAN *et al*, 1993; IREDALE *et al*, 1993; DUCHARME *et al*, 1994; WAINER *et al*, 1994; McLACHLAN *et al*, 1994; WEY *et al*, 1995; DUCHARME *et al*, 1995]. Esses estudos têm mostrado a existência de processos estereosseletivos que podem incluir inversão quiral, absorção, distribuição, metabolismo ou excreção renal. A inversão quiral da HCQ

---

parece não ser significativa [DUCHARME *et al*, 1994 e 1995], assim como sua absorção estereosseletiva [McLACHLAN *et al*, 1994]. Os demais processos, segundo alguns estudos encontrados, parecem ser estereosseletivos [FIEGER *et al*, 1993; McLACHLAN *et al*, 1993; DUCHARME *et al*, 1994; WAINER *et al*, 1994; McLACHLAN *et al*, 1994; WEY *et al*, 1995; DUCHARME *et al*, 1995].

DUCHARME *et al* em um estudo que avaliou a disposição cinética enantiosseletiva da HCQ em humanos sadios submetidos a dose oral única de *rac*-HCQ, observou eliminação mais rápida do enantiômero (+)-(S)-HCQ comparado com o (-)-(R)-HCQ, provavelmente devido à mais rápida excreção urinária e metabolismo hepático. Os metabólitos derivados do (+)-(S)-enantiômero representaram 80-90% da dose urinária recuperada. Não foram detectados metabólitos no sangue e a razão R/S para a HCQ foi >1 [DUCHARME *et al*, 1995].

Os enantiômeros da HCQ eliminados na urina de humanos também foram determinados por FIEGER *et al* que observaram, nas primeiras horas de coleta das amostras, uma quantidade menor de (+)-(S)-HCQ em relação ao (-)-(R)-HCQ; porém, nos tempos de coleta subseqüentes, esta razão foi invertida [FIEGER *et al*, 1993].

Alguns estudos têm sido desenvolvidos em pacientes com artrite reumatóide submetidos a doses únicas ou múltiplas de *rac*-HCQ [McLACHLAN *et al*, 1993; McLACHLAN *et al*, 1994]. McLACHLAN *et al* encontraram, para todos os pacientes, quantidades maiores do (-)-(R)-HCQ que do (+)-(S)-HCQ, tanto no plasma como no sangue total [McLACHLAN *et al*, 1993].

DUCHARME *et al* avaliaram sangue total e plasma de coelhos submetidos a doses múltiplas de *rac*-HCQ e de cada um dos enantiômeros em separado. Para a *rac*-

---

HCQ foi encontrado maior quantidade do enantiômero (+)-(S) em relação ao (-)-(R), no plasma; e no sangue total, as concentrações foram invertidas. Já para os enantiômeros em separado, observou-se maior quantidade de (-)-(R)-HCQ em relação ao (+)-(S)-HCQ. As observações sugerem que o (-)-(R)-HCQ é preferencialmente concentrado pelos compostos celulares do sangue e uma vez fixado, deixaria o enantiômero (+)-(S) mais disponível para o metabolismo [DUCHARME *et al*, 1994].

WEY *et al*, ao estudarem a disposição cinética estereosseletiva da HCQ e seus metabólitos em ratos, obtiveram, em sangue total e em tecidos, razão R/S >1 para os enantiômeros da HCQ e <1 para os enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ, indicando que o enantiômero (+)-(S)-HCQ é preferencialmente metabolizado ou excretado [WEY *et al*, 1995].

Em estudo com pacientes portadores de LES, foram obtidas razões R/S <1 para os enantiômeros da HCQ em urina e R≈S em plasma [BROCKS *et al*, 1992].

### **1.3.2. Análise enantiosseletiva da hidroxiclороquina**

Os únicos métodos descritos para análise enantiosseletiva da HCQ e de seus metabólitos, em urina, plasma ou sangue total, utilizando a técnica de HPLC, apresentam duas etapas de análise. Primeiramente, o fármaco e seus metabólitos são separados e quantificados em sistema aquiral, utilizando coluna com fase estacionária ciano, em modo de eluição fase reversa. Na segunda etapa, os enantiômeros são separados em coluna quiral baseada na  $\alpha_1$  glicoproteína ácida (AGP), também em modo de eluição fase reversa. Em ambas etapas, é empregada a detecção por



---

absorção no UV-Vis ou por fluorescência [McLACHLAN *et al*, 1991; IREDALE & WAINER, 1992; WEY *et al*, 1994; DUCHARME *et al*, 1995].

Outro método descrito faz uso de reação de derivação somente dos enantiômeros da HCQ, formando diastereoisômeros, que são separados em coluna C<sub>8</sub>, em modo de eluição fase reversa e detecção no UV [BROCKS *et al*, 1992].

#### **1.4. Estudo de metabolismo *in vitro***

O metabolismo de uma nova espécie química pelo organismo é um dos mais importantes determinantes de sua disposição farmacocinética. Pode-se dizer que a transformação metabólica de um fármaco é a etapa preliminar à sua eliminação. Na maioria dos casos, o metabolismo leva à inativação do fármaco. Entretanto, em alguns processos metabólicos, pode ser gerado um metabólito ativo, o qual pode ser única ou parcialmente responsável pela resposta farmacológica. Ainda, a transformação metabólica pode produzir intermediários ou metabólitos reativos ou tóxicos, com implicações toxicológicas em potencial [KUMAR & SURAPANENI, 2001].

A procura e o desenvolvimento de métodos *in vitro* para o estudo das biotransformações teve como origem razões éticas, científicas e econômicas. As reações de biotransformação em animais vivos são processos complexos e a utilização de modelos mais simples, como os modelos *in vitro*, tem as suas vantagens [SAÚDE PÚBLICA, 2003]. Métodos *in vitro* são particularmente úteis para seleção racional de espécies de animais, para estudos toxicológicos e para comparação de perfil metabólico, influência de diferentes espécies no metabolismo e produção de metabólitos para desenvolvimento de métodos bioanalíticos [EKINS *et al*, 2000]. Os

---

modelos *in vitro* permitem ainda, estudar uma reação de biotransformação específica sob condições estritamente controladas e a utilização de concentrações extremamente elevadas de xenobióticos, o que, em combinação com uma matriz relativamente limpa, facilita a análise dos metabólitos. O fato de várias amostras de hepatócitos (células hepáticas) de um mesmo indivíduo poderem ser utilizadas simultaneamente em um determinado estudo diminui o erro resultante da variação inter-individual [SAÚDE PÚBLICA, 2003].

O fígado é o órgão escolhido para a realização de estudos sobre a biotransformação de xenobióticos, pois nele estão contidas as enzimas mais abundantes e versáteis. A biotransformação também pode ser realizada em órgãos como rim, pulmões, sangue, parede ou conteúdo do tubo digestivo [SAÚDE PÚBLICA, 2003].

O mais completo sistema para o estudo *in vitro* do metabolismo de fármacos é associado com o grupo de enzimas contidas na super família do citocromo P450 (CYP450). O termo P450 originou-se do estudo da interação do heme com o monóxido de carbono e 450 refere-se ao comprimento de onda, em nm, de absorção máxima do complexo heme-monóxido de carbono reduzido. Mais recentemente foram demonstradas outras heme proteínas nesse sistema enzimático e estas apresentam pequenas diferenças em sua absorção máxima, de maneira a confirmar a existência de uma família de tais proteínas. Estas enzimas são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos administrados ao homem [FDA, 1997]. Existem como múltiplas isoformas, as quais respondem diferentemente a indutores e inibidores específicos. Podem ser citadas como algumas das principais, as isoformas 1A2, 2C9, 2D6 e 3A4.

---

Estima-se haver mais de vinte diferentes isoformas do CYP450 em cada espécie de mamífero [MASIMIREMBWA & HASLER, 1994; JERDI *et al*, 2004].

Microsomas de fígado humano oferecem o modo mais conveniente para estudar o metabolismo com o citocromo P450 (CYP450), mas isoformas de CYP450 de origem animal permitem estudos comparativos a fim de extrapolar resultados de animais para humanos [EKINS *et al*, 2000]. A comparação de dados obtidos com microsomas de fígado humano e de ratos pode demonstrar diferenças qualitativas e quantitativas, dependendo dos parâmetros estudados. Assim, a extrapolação de resultados farmacológicos de animais para humanos, no campo do metabolismo de fármacos, deve ser feito com cautela [KREMERS *et al*, 1981].

Microsomas permitem estudar reações de biotransformação das fases I (oxidação, redução ou hidrólise) e II (conjugação ou síntese) [CERVENKOVÁ *et al*, 2001]. Quanto às reações de oxidação, as mesmas são catalisadas por várias enzimas, sendo que as mais importantes são as oxidases de função mista. Foram demonstradas, nos microsomas, duas oxidases de função mista diferentes baseadas nas sensibilidades pelo monóxido de carbono. Uma delas oxigena o nitrogênio das aminas e forma a hidroxilamina ou amina oxidada. O segundo sistema enzimático apresenta uma heme proteína como oxidase terminal, sendo inibido pelo monóxido de carbono. Esta oxidase sensível ao monóxido de carbono parece ser mais geral nas reações que catalisa, geralmente considerada o sistema enzimático primário na metabolização dos fármacos [SAÚDE PÚBLICA, 2003].

Não foram encontradas informações a respeito das isoformas envolvidas no metabolismo da HCQ. Sabe-se que sua congênera, CQ, possui propriedades inibidoras

---

do CYP450, particularmente no CYP2D6 [MASIMIREMBWA *et al*, 1995]. A primeira (e única, até então) investigação do metabolismo da CQ em microsomas de fígado aponta para as isoenzimas CYP3As e CYP1A2 como as principais isoformas envolvidas [DUCHARME *et al*, 1996].

Para o desenvolvimento de estudos de metabolismo utilizando microsomas de fígado, a fração microsomal celular é obtida por processo de centrifugação diferencial e pode ser definida como a porção do sobrenadante pós-mitocondrial, o qual é sedimentado por força centrífuga de 100.000 – 250.000 x *g*, por 60 – 120 minutos. A natureza morfológica do “pellet” (resíduo sólido resultante) depende do tipo de célula do qual é derivado. Nos hepatócitos, consiste de fragmentos do retículo endoplasmático rugoso e liso. Ao contrário de organelas celulares, como mitocôndria e lisossomos, o retículo endoplasmático é extensivamente rompido por homogeneização e fragmentos da membrana formam uma espécie de aglomeração (“pellet”) de vesículas ou ‘microsomas’ [LAKE, 1987].

Na maioria dos estudos, sugere-se que a fração microsomal deva ser usada no mesmo dia da preparação ou, então, estocada sob condições adequadas. A literatura descreve vários procedimentos de estocagem nos quais são usados sistemas tamponantes em pH entre 7,4 e 7,6, a –20 a –70°C ou, preferencialmente, sob nitrogênio líquido [LAKE, 1987].

Segundo Kremers *et al*, a atividade enzimática de microsomas estocados por poucos meses, a –80°C, não apresentou diferença quando comparada com a atividade de microsomas preparados recentemente [KREMERS *et al*, 1981]. Cervenková *et al*

---

também afirmam que as frações subcelulares, entre elas os microssomas, podem ser estocadas em freezer [CERVENKOVÁ *et al*, 2001].

---

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de métodos de análise empregando a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar e sua aplicação em estudos *in vitro* do metabolismo da hidroxicloroquina, em frações microsossomais de homogeneizados de fígado de ratos e camundongos. Desta forma, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

1. Otimização e validação do método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência para a análise enantiosseletiva dos metabólitos da hidroxicloroquina;
2. Otimização e validação do método empregando a eletroforese capilar para a análise enantiosseletiva dos metabólitos da hidroxicloroquina;
3. Desenvolvimento e otimização de metodologia para estudo *in vitro* de metabolismo em frações microsossomais de homogeneizados de fígado de animais;
4. Aplicação dos dois métodos de análise enantiosseletiva no estudo *in vitro* do metabolismo da hidroxicloroquina em frações microsossomais de homogeneizados de fígado de ratos e camundongos.

---

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Separação por HPLC**

##### **3.1.1. Equipamentos**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por uma bomba modelo LC-10AT VP, um injetor Rheodyne modelo 7725 com amostrador de 50  $\mu$ L, um detector por absorção no ultra-violeta-visível (UV-Vis) modelo SPD-10A e um integrador modelo Chromatopac C-R6A.

No procedimento de preparação das amostras foram utilizados um agitador horizontal de tubos (Pachane Ltda., Piracicaba, Brasil), modelo PA241, um agitador de tubos, tipo "mixer" (Phoenix Equipamentos Científicos, Araraquara, Brasil), modelo AT56 e uma centrífuga Excelsa Baby (Fanem, São Paulo, Brasil), modelo 206.

##### **3.1.2. Solventes e reagentes**

Metanol, isopropanol e clorofórmio (todos grau cromatografia) foram obtidos da EM Science (Gibbstown, EUA); hexano e acetonitrila, também grau cromatográfico, foram obtidos da Mallinckrodt (Paris, EUA) e da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA), respectivamente. A dietilamina (DEA), grau p. a., foi obtida da Fluka (St. Gallen, Suíça) e a N,N dimetiloctilamina (N,N DMOA) foi obtida da Acros Organics (New Jersey, USA). A água foi purificada com o sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA).

### 3.1.3. *Soluções-padrão*

Os padrões da HCQ e de seus três metabólitos, DCQ, DHCQ e BDCQ, empregados na preparação das soluções-padrão foram gentilmente cedidos pela Sanofi/Wintropi Pharmaceuticals (New York, EUA). As soluções estoque de HCQ, DCQ e DHCQ foram preparadas na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol:água (50:50, v/v). As soluções de trabalho, nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foram obtidas a partir de diluições, no mesmo sistema solvente. Todas as soluções foram estocadas a  $-20^\circ\text{C}$  e protegidas da luz.

### 3.1.4. *Colunas quirais*

Chiralpak AD: 250 x 4,6 mm, partículas de  $10 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.

Chiralpak AD-RH: 150 x 4,6 mm, partículas de  $5 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.

Chiralcel OG: 250 x 4,6 mm, partículas de  $10 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.

Chiralpak AS: 250 x 4,6 mm, partículas de  $10 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.

Chiralcel OF: 250 x 4,6 mm, partículas de  $10 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.

Chiralcel OD-H: 150 x 4,6 mm, partículas de  $5 \mu\text{m}$ , Chiral Technologies, Exton, EUA.



---

Chiral AGP: 150 x 4,0 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ , J. T. Baker Incorporation, Phillipsburg, EUA .

### **3.1.5. Amostras de plasma**

As amostras de plasma humano livres do fármaco estudado (nomeadas branco de plasma) foram obtidas no Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes do uso, as amostras foram descongeladas em banho de água a temperatura ambiente e centrifugadas durante 5 minutos a  $1800 \times g$  para remoção do material particulado.

### **3.1.6. Preparação da amostra**

O método escolhido baseia-se na extração líquido-líquido, que tem como fundamento a extração a partir do material biológico com solventes imiscíveis em água. Utilizou-se vidraria cor âmbar nos procedimentos de preparação das amostras e estudo do metabolismo, de modo a evitar possíveis alterações dos padrões em contato com a luz.

A fim de reduzir o uso de animais utilizou-se, para a construção das curvas analíticas e para a validação do método, plasma branco proveniente de voluntários humanos sadios. O plasma foi diluído (65:35, v/v) com tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,4), de modo a obter concentração de proteínas comparável àquela das misturas microssomais de incubação [DUCHARME & FARINOTTI, 1997]. O procedimento de preparação das amostras (plasma diluído em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  ou mistura microssomal) está esquematizado na Figura 6.

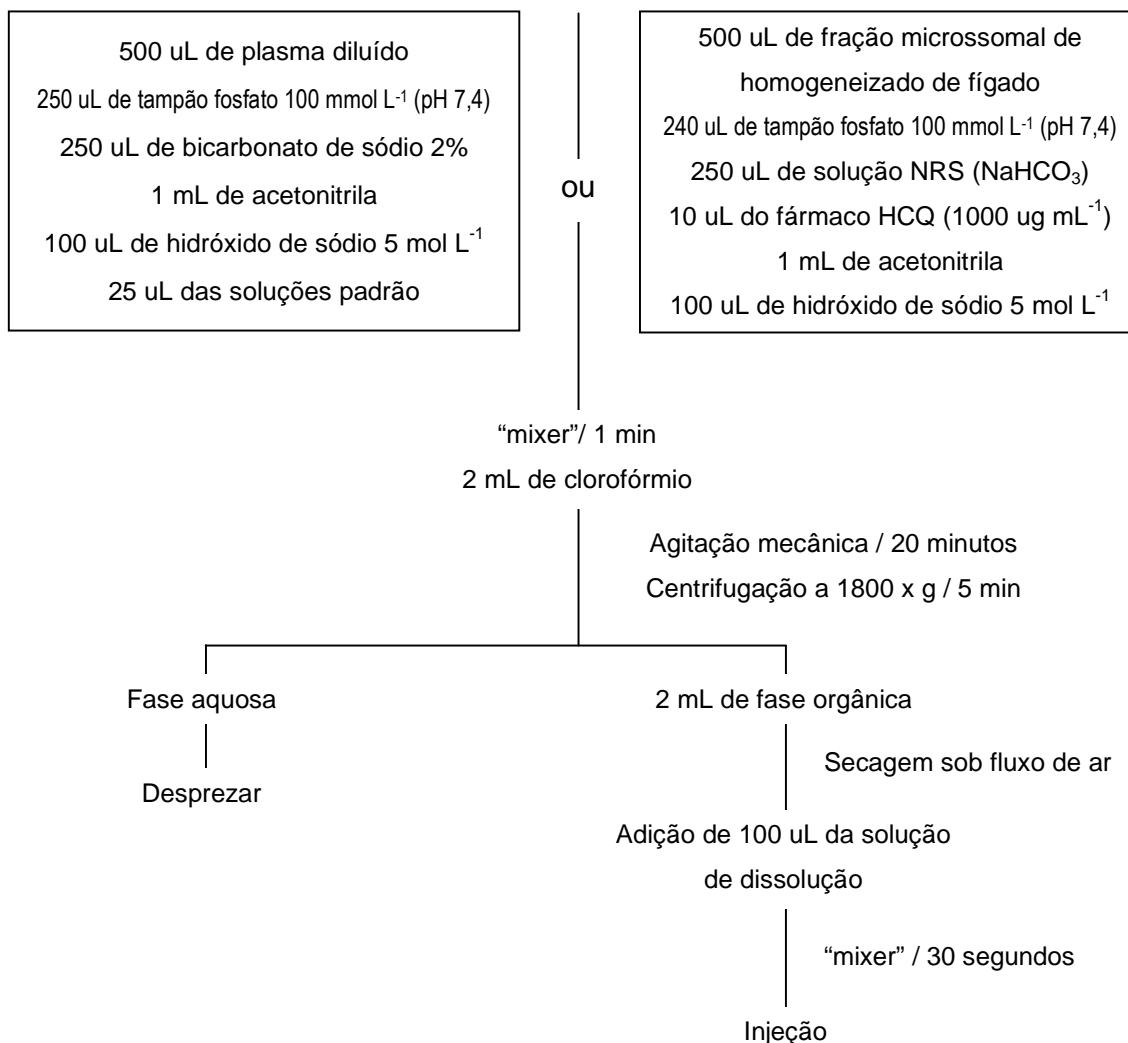


Figura 6: Procedimento de preparação das amostras para análise por HPLC

3.1.7. Condições otimizadas para a análise cromatográfica

**Coluna:** Chiralpak AD-RH, 150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm, adquirida da Chiral Technologies (Exton, USA).

**Coluna de guarda:** RP-8, 10 x 4,6 mm, partículas de 5 µm, adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha).

---

**Fase móvel:** hexano:isopropanol 92:8 (v/v) com 0,1% de DEA.

**Vazão da fase móvel:** 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

**Solução de dissolução:** hexano:isopropanol 92:8 (v/v) com 0,5% de DEA.

**Comprimento de onda para detecção:** 343 nm.

**Volume injetado:** 50 µL

**Fase móvel de lavagem e estocagem da coluna:** hexano:isopropanol 90:10 (v/v)

Foi elaborado um ciclo de lavagem entre as análises, para garantir que não houvesse resíduos dos analitos na seringa de injeção ou no injetor. A seringa era lavada primeiramente com solução metanol:água 1:1 (v/v) acrescida de 5% de ácido acético (10 repetições), com etanol p. a. (10 repetições) e, para finalizar, com a fase móvel empregada na análise (10 repetições). O injetor era lavado com a própria fase móvel empregada na análise (2 repetições).

### **3.1.8. Validação do método**

#### **3.1.8.1. Calibração e linearidade**

Para obtenção das curvas analíticas, alíquotas de 25 µL das soluções-padrão racêmicas dos metabólitos DCQ e DHCQ, em duplicata, foram transferidas para tubos de extração âmbar com tampas esmerilhadas, contendo 500 µL de plasma branco diluído. As concentrações das soluções-padrão racêmicas dos metabólitos foram 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>, resultando em concentrações plasmáticas de 50, 125, 250, 500, 1250, 2500 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero. A seguir, os procedimentos

---

de extração e análise cromatográfica foram efetuados empregando as condições descritas nos itens 3.1.6 e 3.1.7, respectivamente.

Foram construídas curvas analíticas das concentrações dos enantiômeros *versus* as áreas dos picos para o metabólito DCQ e concentrações dos enantiômeros *versus* as alturas medidas manualmente para o metabólito DHCQ. A regressão linear foi utilizada para a determinação das concentrações dos enantiômeros nas amostras.

#### 3.1.8.2. Recuperação

A eficiência do procedimento de extração foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica com seis pontos, não submetida à extração. Para isto, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  das soluções-padrão racêmicas de cada metabólito, nas mesmas concentrações empregadas no item 3.1.8.1, foram transferidas para tubos âmbar cônicos e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar. Os resíduos, dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  da solução de dissolução, foram submetidos à agitação e analisados, segundo condições descritas no item 3.1.7.

A seguir, duplicatas de amostras de plasma diluído fortificadas com as soluções-padrão dos metabólitos, nas concentrações de 250, 500, 1250 e 2500  $\text{ng mL}^{-1}$  de cada enantiômero, foram também analisadas, após terem sido submetidas ao procedimento de extração.

A concentração dos enantiômeros dos fármacos estudados nas amostras de plasma foi calculada empregando-se a curva analítica correspondente às soluções não submetidas ao procedimento de extração. A recuperação (R, em %) foi calculada através da Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração no min al}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.1.8.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método desenvolvido foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. Amostras de plasma branco diluído foram fortificadas com as soluções-padrão racêmicas dos metabólitos nas concentrações de 250, 1250 e 2500 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero. O preparo das amostras de plasma fortificadas com as soluções-padrão está esquematizado na Tabela 1.

Tabela 1: Preparo das amostras de plasma fortificadas

Concentração plasmática de cada enantiômero (ng mL <sup>-1</sup> )	Solução padrão estoque (µg mL <sup>-1</sup> )	Vol. da solução estoque (µL)
250	20	500
1250	100	500
2500	200	500

Cada solução-padrão estoque foi transferida para tubo com tampa esmerilhada e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar. A seguir, foram adicionados 20 mL de plasma branco diluído. Os tubos foram vedados e levados à agitação mecânica durante 30 minutos. Alíquotas de 4 mL foram distribuídas em tubos menores, também com tampa esmerilhada, e foram estocadas a -20°C até o momento da análise.

No estudo da precisão e exatidão intra-ensaio foram analisadas cinco alíquotas (n=5) de uma mesma concentração e, no estudo da precisão e exatidão interensaios, foram considerados os resultados das análises das três diferentes concentrações, em três dias diferentes (n=3), em quintuplicata, para cada concentração.

As concentrações dos enantiômeros dos analitos nas amostras foram determinadas a partir de curvas analíticas preparadas diariamente, nas concentrações de 125, 250, 1250, 2500 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero. As amostras fortificadas e as amostras correspondentes às curvas analíticas, após serem submetidas ao procedimento de extração (item 3.1.6), foram analisadas conforme descrito no item 3.1.7.

Para avaliação da precisão do método, a dispersão dos resultados foi calculada (Equação 3) em relação aos valores médios e expressa como coeficiente de variação (CV).

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

onde: S = estimativa do desvio padrão

$\bar{X}$  = média dos valores obtidos

Nos cálculos de exatidão foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e interensaios e a concentração nominal presente na amostra, segundo a Equação 4.

---

$$E = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração no min al}}{\text{concentração no min al}} \times 100 \quad (4)$$

#### 3.1.8.4. *Limite de quantificação*

As amostras de branco de plasma diluído foram fortificadas, em quintuplicata, com dois níveis de concentração abaixo do primeiro ponto da curva, 25 e 50 ng mL<sup>-1</sup> e com a concentração do primeiro ponto da curva, 125 ng mL<sup>-1</sup>.

As concentrações dos enantiômeros nas amostras foram determinadas a partir de uma curva analítica, nas concentrações de 125 a 5000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero, para o metabólito DCQ e 125 a 2500 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero, para o metabólito DHCQ. As amostras fortificadas e as amostras da curva analítica, após serem submetidas ao procedimento de extração (item 3.1.6), foram analisadas conforme descrito no item 3.1.7.

#### 3.1.9. *Ordem de eluição*

Os enantiômeros foram previamente separados e coletados de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.1.7. A seguir, os enantiômeros individuais foram analisados em uma coluna CHIRAL AGP, segundo o método descrito por Iredale & Wainer [IREDALE & WAINER, 1992], empregando fase móvel constituída por solução tampão fosfato de sódio 30 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0):etanol:acetonitrila 79:20:1 (v/v/v) contendo N,N-dimetiloctilamina 5 mmol L<sup>-1</sup>, a uma vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

## **3.2. Separação por CE**

### **3.2.1. Equipamentos**

A análise dos enantiômeros da HCQ e de seus três metabólitos foi realizada em um equipamento proveniente da Agilent Technologies, modelo 61600A (Waldbronn, Alemanha), constituído por um analisador, um amostrador automático, um detector por arranjo de diodos e um sistema de aquisição de dados com o software Agilent ChemStation.

Um pHmetro Digimed proveniente da Digicrom Analítica, modelo DM-20 (Santo Amaro, Brasil) foi empregado para medir o pH das soluções aquosas. Para eliminar o ar dissolvido nas soluções foi utilizado um ultrassom Thorton, modelo Ultrasonic Cleaner (Santo Amaro, Brasil).

Na preparação das soluções-padrão e de eletrólitos foi utilizada balança analítica Ohaus Corp. (Pine Brook, EUA), modelo Adventurer.

No procedimento de preparação das amostras foram utilizados um agitador horizontal de tubos Pachane (Piracicaba, Brasil), modelo PA241, um agitador de tubos, tipo “*mixer*” Phoenix (Araraquara, Brasil), modelo AT56 e uma centrífuga Excelsa Baby Fannen (São Paulo, Brasil), modelo 206.

Utilizou-se o sistema MILLI-Q PLUS – Millipore Corporation (Bedford, EUA) para purificação da água empregada no preparo das soluções e no procedimento de lavagem dos capilares.



### 3.2.2. Solventes e reagentes

Os solventes utilizados na preparação das soluções-padrão dos fármacos e no procedimento de extração foram grau cromatográfico. Tolueno foi obtido da Omnisolv (Darmstadt, Alemanha) e a acetonitrila foi obtida da Mallinckrodt (Paris, EUA).

Os reagentes empregados na preparação das soluções de eletrólitos foram grau p. a.. Fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico dihidratado, acetato de sódio e ácido bórico foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico foi obtido da Synth (Diadema, Brasil), tris(hidroximetil)aminometano foi obtido da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA), fosfato de sódio tribásico dodecahidratado foi obtido da Química Fina Ltda. (Rocha, Brasil) e trietanolamina foi obtida da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). As soluções de eletrólitos foram armazenadas a -4°C por, no máximo, 1 mês.

A  $\beta$ -CD hidroxipropilada e a maltodextrina foram obtidas da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, EUA); a  $\beta$ -CD carboximetilada e *heptakis* (2, 3, 6 – tri – O – metil- $\beta$ -CD) foram obtidas da Fluka (Steinheim, Suíça) e a  $\beta$ -CD sulfatada foi obtida da Supelco (Bellefonte, EUA).

As soluções usadas no equipamento de CE foram filtradas diariamente, em filtro MILLEX – HA com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ , obtidos da MILLIPORE (Bedford, EUA) e levadas ao ultrassom para eliminação de bolhas.

### 3.2.3. Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-estoque de HCQ e de uma mistura de DCQ, BDCQ e DHCQ na concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada enantiômero. A partir destas

---

soluções, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para cada enantiômero da HCQ e 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para cada enantiômero dos metabólitos.

#### **3.2.4. Capilares**

Os capilares de sílica fundida, revestidos com uma camada de poliimida, foram provenientes da Thermo Separations Products, Inc. (San Jose, EUA) e da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). Foram testados os comprimentos de 37 cm, com 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 50 cm, com 75 e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. Foi feita uma janela de detecção, de aproximadamente 0,5 cm, com a queima do revestimento de poliimida, a partir de 8 cm da extremidade do capilar. Após a queima, a região foi limpa com algodão embebido em metanol.

##### *3.2.4.1. Condicionamento de capilares novos*

Antes do uso, os capilares novos foram condicionados através das seguintes etapas de lavagem:

- a) solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> a 30°C durante 1,0 minuto,
- b) solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 20°C durante 10,0 minutos,
- c) água a 20°C durante 10,0 minutos.

##### *3.2.4.2. Armazenamento dos capilares*

No final de cada dia, o capilar em uso era lavado com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> seguido de água. Ambas lavagens eram feitas a 20°C durante 4,0 minutos.

Durante a noite, as duas extremidades do capilar permaneciam imersas em água.

### 3.2.5. Soluções de eletrólitos

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam as soluções de eletrólitos utilizadas na otimização das condições de análise.

Tabela 2: Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 50 cm x 75  $\mu\text{m}$

Solução tampão	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Seletor quiral	pH
Borato	50	1,0% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
Fosfato	50	0,5 e 0,7% de S- $\beta$ -CD	9,0
		0,5% de S- $\beta$ -CD + 20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,7% de S- $\beta$ -CD + 20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,8% de S- $\beta$ -CD + 20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,7% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,8% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,8% de S- $\beta$ -CD + 50 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		1,0% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,8% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	8,0

As soluções tampão acetato, borato e fosfato foram preparadas a partir da equação para pH de tampão (Equação 5), de acordo com o pH desejado. Foram

utilizados ácido acético/acetato de sódio trihidratado e ácido bórico/borato de sódio para as soluções tampão acetato e borato, respectivamente. Para as soluções tampão fosfato foram utilizados ácido fosfórico/fosfato monossódico monohidratado para pH 3,0, fosfato monossódico monohidratado/fosfato dissódico dihidratado para pH 6,0 e 9,0 e fosfato dissódico dihidratado/fosfato de sódio tribásico para pH 11,0. A solução tampão tris(hidroximetil)aminometano teve pH ajustado com ácido fosfórico. O tampão fosfato/trietanolamina foi preparado a partir de uma solução de ácido fosfórico adicionada de trietanolamina até o pH desejado.

$$pH = pKa + \log \frac{[sal]}{[ácido]} \quad (5)$$

Tabela 3: Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 37 cm x 75 µm.

Solução tampão	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Seletor quiral	pH
Borato	50	1% S-β-CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> HP-β-CD	9,0
Fosfato	20	1% S-β-CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> HP-β-CD	6,0
	20	1% S-β-CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> HP-β-CD	9,0
	50	1% S-β-CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> HP-β-CD	9,0
Tris	100	1% S-β-CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> HP-β-CD	9,0

Tabela 4: Soluções de eletrólitos empregadas na otimização das condições de análise utilizando capilar Thermo Separations Products de 37 cm x 75  $\mu\text{m}$

Solução tampão	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Seletor quiral	PH
Acetato	50	0,1% de S- $\beta$ -CD	3,0
		0,5% de S- $\beta$ -CD	9,0
Fosfato	20	5,0% de maltodextrina	3,5
	30	1,0% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
	50	0,5% de S- $\beta$ -CD	3,0, 6,0, 9,0 e 11,0
		0,1, 0,2, 0,3 e 0,4% de S- $\beta$ -CD	9,0
		0,5% de S- $\beta$ -CD + 20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		0,7% de S- $\beta$ -CD + 20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
		1,0% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0
	1,5% de S- $\beta$ -CD + 30 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	9,0	
Tris	20	13 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD (2%)	3,1
		20 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD (3%)	3,1
		27 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD (4%)	3,1
Ácido fosfórico	100	5 mmol L <sup>-1</sup> de CM- $\beta$ -CD	3,0
		15 mmol L <sup>-1</sup> de HP- $\beta$ -CD	3,0
		15 mmol L <sup>-1</sup> de TM- $\beta$ -CD	3,0

### **3.2.6. Amostras de plasma e de frações microssomais**

As amostras de plasma utilizadas nesta etapa do trabalho foram obtidas e tratadas da mesma forma que aquelas descritas no item 3.1, sub-item 3.1.5.

As amostras de frações microssomais foram isoladas de fígado de ratos ou camundongos, obtidos no Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), classificação SPF (do inglês, *Specific Patogen Free*).

### **3.2.7. Preparação da amostra**

O procedimento foi aplicado em amostras de plasma humano diluído para as análises referentes à validação do método e em amostras de fração microssomal de homogeneizado de fígado para aplicação do método (item 3.4).

O plasma foi diluído (65:35, v/v) com solução tampão fosfato de potássio 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,1, de forma a obter concentração de proteínas comparável àquela das misturas microssomais [DUCHARME & FARINOTTI, 1997].

O pH do meio aquoso foi ajustado a alcalino a fim de que os analitos permanecessem na forma não ionizada. O procedimento completo de preparação das amostras está esquematizado na Figura 7.

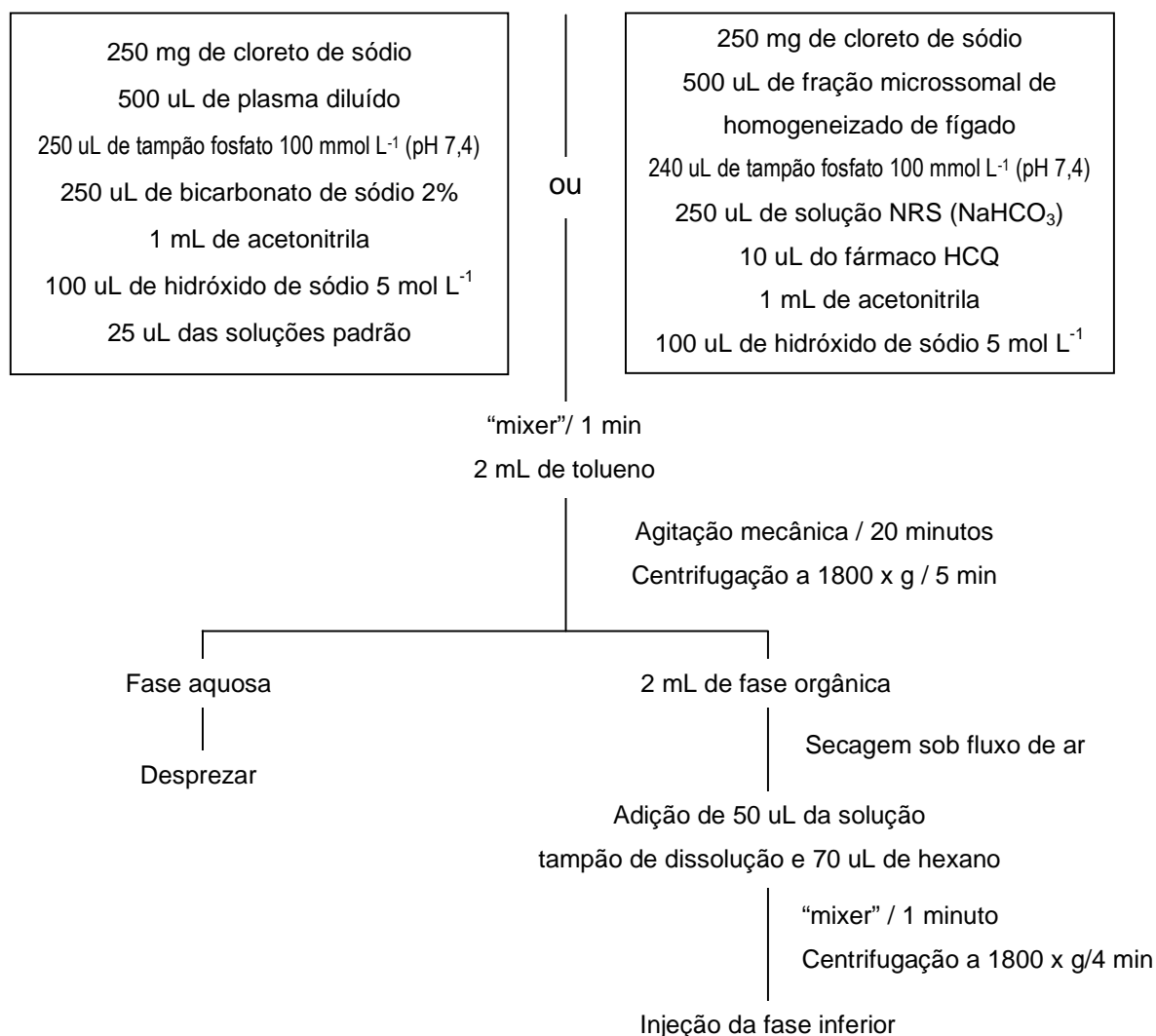


Figura 7: Procedimento para preparação das amostras para análise por CE

### 3.2.8. Condições otimizadas para a análise eletroforética

Para garantir a limpeza e equilibrar a superfície interna do capilar foi elaborado um ciclo de lavagem, entre cada uma das análises realizadas:

- a) solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 2 minutos,

b) água durante 3 minutos,

c) solução do eletrólito contendo o seletor quiral durante 3 minutos.

As condições definitivas para a análise são descritas a seguir:

**Capilar:** 42 cm de comprimento efetivo (50 cm de comprimento total) e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, proveniente da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha).

**Temperatura:** constante a 20°C durante todas as etapas.

**Solução de eletrólitos:** solução tampão tris(hidroximetil)aminometano 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 9,0 contendo 1% (m/v) de S- $\beta$ -CD e 30  $\text{mmol L}^{-1}$  de HP- $\beta$ -CD.

**Voltagem:** 13 kV.

**Modo e tempo de injeção:** hidrodinâmica, 50 mbar durante 15 segundos.

**Solução eletrolítica de dissolução:** 50  $\mu\text{L}$  de solução tampão tris(hidroximetil)aminometano 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 2,0 (fase submetida à partição com 70  $\mu\text{L}$  de hexano).

**Comprimento de onda de detecção:** 220 nm.

Os reservatórios de solução tampão (com e sem o seletor quiral) eram substituídos a cada três análises consecutivas, bem como os reservatórios de solução de NaOH e H<sub>2</sub>O utilizados nos ciclos de lavagem do capilar.

### **3.2.9. Validação do método**

#### **3.2.9.1. Calibração e linearidade**

Curvas analíticas com cinco pontos foram construídas transferindo-se alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  das soluções-padrão racêmicas do fármaco e dos metabólitos, em duplicata,



para tubos de extração âmbar com tampas esmerilhadas, contendo 500  $\mu\text{L}$  de plasma branco diluído. A seguir, os procedimentos de extração e análise eletroforética foram efetuados empregando as condições descritas nos itens 3.2.7 e 3.2.8, respectivamente.

A Tabela 5 descreve as concentrações usadas nesta etapa de validação.

Tabela 5: Avaliação da linearidade do método desenvolvido

Analito	Concentração das soluções ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração de cada enantiômero nas amostras ( $\text{ng mL}^{-1}$ )
HCQ	25 a 400	625, 1250, 2500, 5000 e 10000
DHCQ	5 a 80	125, 250, 500, 1000 e 2000
DCQ	5 a 80	125, 250, 500, 1000 e 2000
BDCQ	5 a 80	125, 250, 500, 1000 e 2000

Foram construídas curvas analíticas relacionando as concentrações dos enantiômeros *versus* áreas dos picos/tempo de migração e foi utilizada a regressão linear para a determinação das concentrações dos enantiômeros nas amostras.

### 3.2.9.2. Recuperação

A eficiência do procedimento de extração foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica com cinco pontos. Para isto, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  da solução-padrão racêmica de cada analito, nas concentrações estabelecidas no item 3.2.9.1, foram transferidas para tubos âmbar cônicos e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar. Os resíduos, dissolvidos em 50  $\mu\text{L}$  da solução de eletrólitos diluída dez vezes e 70  $\mu\text{L}$  de

---

hexano, foram submetidos à agitação, centrifugação e após separação das fases, a fase aquosa foi injetada, segundo condições descritas no item 3.2.8.

A seguir, duplicatas de amostras de plasma diluído fortificadas com as soluções-padrão dos analitos, no mesmo intervalo de concentração, foram também analisadas, após terem sido submetidas ao procedimento de extração.

As concentrações dos enantiômeros dos fármacos estudados nas amostras de plasma foram calculadas empregando-se a curva analítica não submetida ao procedimento de extração. A recuperação (R, em %) foi calculada através da Equação 2.

#### 3.2.9.3. *Precisão e Exatidão*

A precisão e a exatidão do método desenvolvido foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. Amostras de plasma branco diluído foram fortificadas com as soluções-padrão racêmicas da HCQ e de seus metabólitos nas concentrações descritas na Tabela 6.

Cada solução-padrão estoque foi transferida para tubo com tampa esmerilhada e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar. A seguir, foram adicionados 20 mL de plasma branco diluído. Os tubos foram vedados e levados à agitação mecânica durante 30 minutos. Alíquotas de 4 mL foram distribuídas em tubos menores, também com tampa esmerilhada, e foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Tabela 6: Esquema do preparo das amostras fortificadas empregadas no estudo da precisão e exatidão

<b>Analito</b>	<b>Concentração plasmática de cada enantiômero (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solução-padrão estoque (µg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vol. da solução estoque (µL)</b>
HCQ	1875	50	1500
	5000	1000	200
	8750	1000	350
Metabólitos	375	50	300
	1000	50	800
	1750	50	1400

No estudo da precisão e exatidão intra-ensaio, foram analisadas cinco alíquotas (n=5) de cada concentração e, no estudo da precisão e exatidão interensaios, foram considerados os resultados das análises de três diferentes concentrações, em três dias diferentes (n=3), em quintuplicata, para cada concentração.

As concentrações dos enantiômeros dos analitos nas amostras foram determinadas a partir de curvas analíticas preparadas diariamente. As amostras fortificadas e as amostras da curva analítica, após serem submetidas ao procedimento de extração (item 3.2.7), foram analisadas conforme descrito no item 3.2.8.

Para a precisão do método, a dispersão dos resultados foi calculada em relação aos valores médios e expressa como coeficiente de variação (CV) (Equação 3).

Nos cálculos de exatidão foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e interensaios e a concentração real presente na amostra, segundo a Equação 4.

#### 3.2.9.4. Limite de quantificação

As amostras de branco de plasma diluído foram fortificadas com dois níveis de concentração de cada enantiômero, uma delas abaixo do primeiro ponto da curva e a outra, o próprio ponto, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Esquema do preparo das amostras fortificadas empregadas na avaliação do limite de quantificação

Analito	Concentração plasmática de cada enantiômero
	(ng mL <sup>-1</sup> )
HCQ	312,5 e 625
DHCQ	62,5 e 125
DCQ	62,5 e 125
BDCQ	62,5 e 125

### 3.3. Estudo de metabolismo

#### 3.3.1. Equipamentos

Os fígados de animais foram homogeneizados com um homogeneizador do tipo “Potter”, provido de um circulador de água para controle de temperatura, modelo MA

---

181 acoplado a um agitador mecânico modelo MA 039 (Marconi, São Paulo, Brasil). As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga modelo HIMAC CF 15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) e em uma ultra-centrífuga BECKMAN XL-70 (Beckman, Carlsbad, EUA). Para a dosagem de proteínas foi utilizado um espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS™ (Spectronic Instruments, Nova Iorque, EUA). As incubações foram realizadas em um banho-maria com agitação Dubnoff (Marconi, São Paulo, Brasil).

### **3.3.2. Solventes e reagentes**

Os sais fosfato de potássio monobásico e dibásico foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). O HEPES foi obtido da Sigma-Aldrich. (Steinheim, Alemanha). As substâncias  $\beta$ -Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP), glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfato desidrogenase e soro-albumina bovina 96% (BSA, do inglês, *Bovine Serum Albumin*) foram obtidas da Sigma (St. Louis, EUA). O tris (base) (hidroximetil)aminometano, o tartarato de sódio e a uréia foram obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e o sulfato de cobre pentahidratado foi obtido da Reagem (Rio de Janeiro, Brasil). O deoxicolato de sódio foi obtido da Thermo Separation Products (San Jose, EUA). A água foi purificada com o sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA).

### **3.3.3. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos e adultos e camundongos Balb-C machos, pesando, respectivamente, de 180 a 200 g e de 20 a 30 g. Estes animais

---

foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, classificação SPF (do inglês Specific Patogen Free).

### **3.3.4. Procedimento de incubação**

#### *3.3.4.1. Isolamento das frações microssomais de homogeneizado de fígado*

Os animais, ambientados a 25 °C com ciclos de luz de 12 horas, foram submetidos a jejum por uma noite, antes dos experimentos. Pela manhã, os animais foram anestesiados com éter e seus fígados foram submetidos à perfusão [JONES, 1987] com cloreto de sódio a 0,9% (m/v), lavados com cloreto de potássio 0,154 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4), triturados e homogeneizados (3 ciclos) em um homogeneizador do tipo "Potter". O homogeneizado foi filtrado através de duas camadas de gaze para remover tecidos residuais e o volume foi ajustado com a solução de cloreto de potássio de modo a obter uma suspensão a 20% (m/v), aproximadamente. O procedimento de isolamento dos microssomas [VON BAHR *et al*, 1980; LAKE, 1987] está representado na Figura 8.

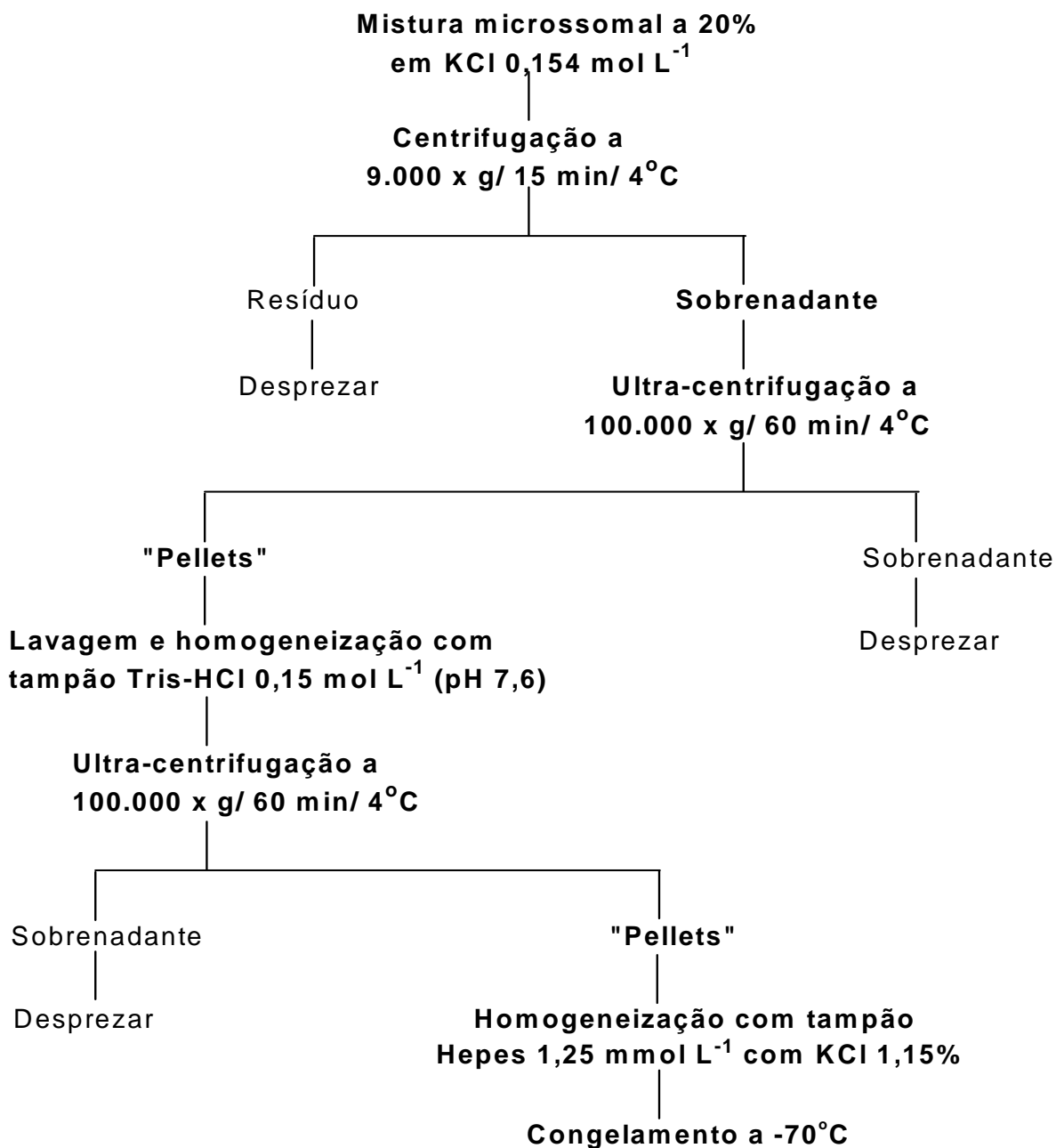


Figura 8: Procedimento para isolamento da fração microssomal de homogeneizado de fígado

### 3.3.4.2. Otimização das condições de incubação

Toda a etapa de otimização das condições de incubação foi feita empregando o método desenvolvido por HPLC.

No procedimento inicial de incubação dos microssomas [INVITROTECH, 2001], cada amostra consistiu de 500  $\mu\text{L}$  de microssomas, 240  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4) e 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de HCQ. A solução de incubação - NRS (do inglês, *NADPH regenerating system*) - consistiu de 1,7  $\text{mg mL}^{-1}$  de NADP, 7,8  $\text{mg mL}^{-1}$  de glicose-6-fosfato e 1,5 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase em uma solução de bicarbonato de sódio a 2%. As amostras e a solução NRS foram acondicionadas em banho-maria por 5 minutos. Após esse tempo, 250  $\mu\text{L}$  da solução NRS foi adicionada às amostras a fim de iniciar a reação. Após 180 minutos, a incubação foi interrompida pela adição de 1 mL de acetonitrila e as amostras foram submetidas à extração e análise cromatográfica ou eletroforética.

O tempo de incubação, a concentração da HCQ racêmica e o volume de microssomas foram otimizados. Primeiramente, foram incubadas amostras em diferentes tempos (30, 90 e 180 minutos), fixando o volume de microssomas em 500  $\mu\text{L}$  e a concentração de HCQ em 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, foram testadas diferentes concentrações de HCQ racêmica (200, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), fixando o tempo de incubação em 180 minutos e o volume de microssomas em 500  $\mu\text{L}$ . Por último, variou-se o volume de microssomas (200, 300, 500 e 1000  $\mu\text{L}$ ), fixando o tempo de incubação em 180 minutos e a concentração de HCQ em 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A Tabela 8 mostra as condições definitivas para a incubação.



Tabela 8: Condições otimizadas para o estudo *in vitro* de metabolismo

Espécie de animal	Ratos Winstar e camundongos Balb-C
Anestésico	Éter etílico
Volume do homogeneizado de microsomas	500 $\mu\text{L}$
Tempo de incubação	180 minutos
Concentração da HCQ racêmica	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Volume da solução de HCQ	10 $\mu\text{L}$

Após a definição das condições de incubação, foram realizados outros testes. Para avaliar a influência do anestésico empregado, os experimentos de metabolismo também foram feitos com amostras de microsomas de animais anestesiados com 400  $\mu\text{L}$  de tiopental intra-peritoneal (i.p.). Amostras de microsomas de animais tratados com o indutor de metabolismo fenobarbital [MASIMIREMBA & HASLER, 1994] também foram incubadas, com o objetivo de verificar se a metabolização aumentaria com o uso desse indutor. Fenobarbital a 4  $\text{mg mL}^{-1}$ , em NaCl 0,9% foi injetado na quantidade de 50  $\text{mg/Kg}$  de rato, por quatro dias consecutivos. No quinto dia, as frações microsomais desses ratos e de quatro ratos-controle (sem a administração do indutor) foram isoladas.

Todos os testes de otimização (realizados em triplicata) foram efetuados com microsomas isolados de fígado de ratos. Após serem submetidas ao procedimento de extração (item 3.1.6), as amostras foram analisadas conforme descrito no item 3.1.7.

---

As concentrações dos enantiômeros dos metabólitos formados foram determinadas a partir de curvas analíticas também submetidas ao procedimento de extração (item 3.1.8.1).

#### 3.3.4.3. *Incubação com fração mitocondrial de homogeneizado de fígado*

O objetivo dessa etapa do trabalho era verificar a possível metabolização da HCQ a partir de frações mitocondriais, também isoladas de fígado de ratos. Neste experimento os animais foram anestesiados com 400  $\mu\text{L}$  de tiopental i. p..

Os animais foram submetidos à perfusão conforme item 3.3.4.1. Os fígados extraídos foram lavados, em banho de gelo, com uma solução de homogeneização que consistiu de sacarose 250  $\text{mmol L}^{-1}$ , EGTA 1  $\text{mmol L}^{-1}$  e HEPES/KOH 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4). Foram triturados e lavados novamente com a solução anterior e homogeneizados em homogeneizador do tipo “Potter” (3 ciclos), com aproximadamente 25 mL da solução. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 580 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi centrifugado a 10300 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado, o “pellet” foi lavado com solução de lavagem que consistiu de sacarose 250  $\text{mmol L}^{-1}$ , EGTA 0,3  $\text{mmol L}^{-1}$  e HEPES/KOH 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4) e foi centrifugado a 3400 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspenso em uma solução de sacarose 250  $\text{mmol L}^{-1}$  e HEPES/KOH 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4) [CAIN & SKILETTER, 1987].

A incubação foi realizada nas mesmas condições selecionadas para a incubação com microssomas e imediatamente após seu isolamento, pois sua atividade enzimática é mantida por no máximo 3 horas.

### 3.3.5. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas nas frações microsossomais foi determinada segundo Cain & Skilleter [CAIN & SKILLETER, 1987] e o procedimento está representado na Tabela 9.

Tabela 9: Procedimento para a dosagem de proteínas

	Branco	Padrões	20 $\mu$ L de amostra <sup>a</sup>
Deoxicolato de sódio 5% ( $\mu$ L)	100	100	100
Água ( $\mu$ L)	1400	1300	1380
Biureto <sup>b</sup> ( $\mu$ L)	1500	1500	1500
BSA 1% ( $\mu$ L)	-	100	-

<sup>a</sup> Plasma diluído, fração microsossomal e fração mitocondrial.

<sup>b</sup> Sulfato de cobre pentahidratado 0,15% e tartarato de sódio e potássio 0,6% em hidróxido de sódio 0,75 mol L<sup>-1</sup>.

Após o preparo, as amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo “mixer” e suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de proteínas foi calculada pela Equação 6.

$$\frac{A}{P} \times 50 = [\text{proteínas}] \text{ em mg mL}^{-1} \quad (6)$$

### 3.4. Aplicação dos métodos

Os métodos desenvolvidos foram aplicados em um estudo *in vitro* de metabolismo usando frações microsossomais isoladas de fígado de ratos Winstar e de camundongos Balb-C, com concentração de proteínas da ordem de  $39 \text{ mg mL}^{-1}$  no método utilizando HPLC e  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  para o método de CE. Foram utilizadas frações microsossomais de ratos e de camundongos para aplicação em HPLC e frações microsossomais de camundongo para aplicação em CE. As frações foram adicionadas de HCQ racêmica ( $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada enantiômero) para aplicação do método de HPLC e CE e com os enantiômeros puros ( $420 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de (-)-(R)-HCQ e  $630 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de (+)-(S)-HCQ, aproximadamente), somente para o método de HPLC. A seguir, foram submetidas ao procedimento de incubação, como descrito no item 3.3.4. As amostras, após serem submetidas ao procedimento de extração (item 3.1.6 e 3.2.7), foram analisadas conforme descrito no item 3.1.7 e 3.2.8.

As concentrações dos enantiômeros dos metabólitos formados foram determinadas a partir de curvas analíticas também submetidas ao processo de extração.

---

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Otimização da separação por HPLC*

#### 4.1.1. *Resolução quiral*

O fármaco HCQ e seus metabólitos DCQ e DHCQ haviam sido previamente resolvidos em nosso laboratório, usando uma coluna Chiralpak AD e hexano:isopropanol 90:10 (v/v) com 0,1% de DEA como fase móvel [ABREU & BONATO, 2001]. Esta coluna é empregada em condição de fase normal e a CSP é obtida a partir do derivado tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose. O principal sítio de reconhecimento quiral são os grupos carbamato polares [YASHIMA & OKAMOTO, 1995]. Esta separação não pôde ser reproduzida após uso da coluna para análise de outros fármacos, sob diferentes condições, portanto algumas outras fases móveis foram avaliadas.

A separação dos enantiômeros da HCQ, DCQ e DHCQ com esta coluna somente foi possível usando hexano:metanol 96:4 (v/v) com 0,4% de DEA como fase móvel (Figura 9). Entretanto, com essa fase móvel observaram-se mudanças de cerca de 5 minutos nos tempos de retenção durante uso prolongado, o que inviabilizou sua utilização para desenvolvimento do método.

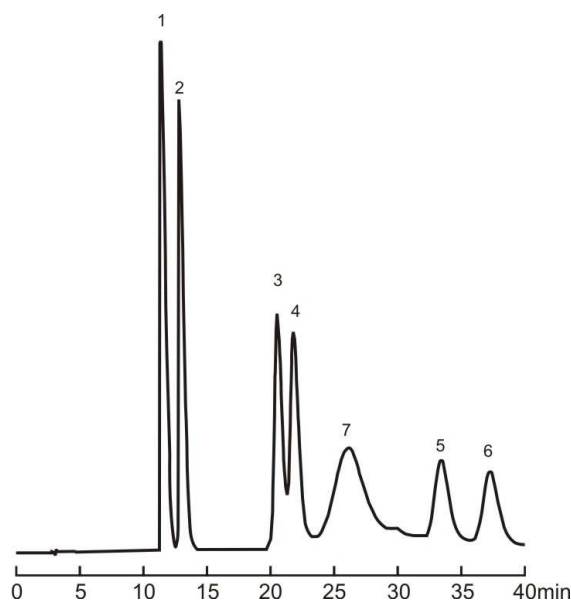


Figura 9: Cromatograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos DCQ e DHCQ na coluna Chiralpak AD: (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-DHCQ (3), (+)-(S)-DHCQ (4) e *rac*-BDCQ (5). Condições cromatográficas: Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm, partículas de 10  $\mu\text{m}$ ); hexano:metanol (96:4, v/v) com 0,4% de DEA como fase móvel (vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ ) e detecção em 343 nm.

Outras colunas com CSPs baseadas em polissacarídeos também foram avaliadas (item 3.1.4) em condições de fase normal (Chiralpak AS, Chiralpak AD-RH, Chiralcel OG, Chiralcel OF e Chiralcel OD-H) e em condições de fase reversa (Chiralpak AD-RH e Chiralcel OD-H). Porém, em nenhuma destas colunas foram obtidos resultados positivos. Na maioria das vezes observou-se coeluição de dois ou mais analitos.

O sucesso na resolução quiral da HCQ e de seus metabólitos foi obtido usando a coluna Chiralpak AD-RH. Esta coluna possui o derivado tris(3,5 – dimetilfenilcarbamato) de amilose como seletor quiral, incorporado a partículas de sílica de 5  $\mu\text{m}$ . Recomenda-

se o uso desta coluna no modo de eluição fase reversa, mas no presente estudo, a mesma foi utilizada no modo de eluição fase normal, com uma fase móvel constituída por hexano:isopropanol 92:8 (v/v) e 0,1% de DEA. Os seis picos dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos DCQ e DHCQ eluíram com um tempo de retenção total de aproximadamente 35 minutos [Figura 10]. Sob estas condições, o outro metabólito da HCQ (BDCQ) pôde ser separado dos demais picos, mas não foi possível a resolução quiral de seus enantiômeros.

Na análise dos extratos das amostras, a coluna foi protegida por uma coluna de guarda RP-8.

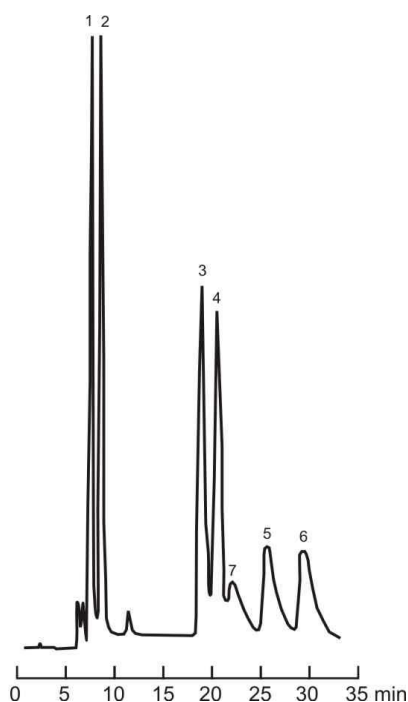


Figura 10: Cromatograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos DCQ e DHCQ na coluna Chiralpak AD-RH: (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-HCQ (3) e (+)-(S)-HCQ (4), (-)-(R)-DHCQ (5), (+)-(S)-DHCQ (6) e *rac*-BDCQ (7). Condições

---

cromatográficas: Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ );  
hexano:isopropanol (92:8, v/v) com 0,1% de DEA como fase móvel (vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ )  
e detecção em 343 nm.

#### **4.1.2. Preparação das amostras**

A análise cromatográfica de analitos em amostras biológicas (soro, plasma, urina, frações microssomais, etc), em geral, requer um pré-tratamento da amostra. Inúmeras razões justificam essa necessidade, entre elas, a complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração dos analitos a serem analisados. O objetivo final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com os analitos de interesse, a fim de obter-se uma separação cromatográfica livre de interferentes [QUEIROZ *et al*, 2001].

A extração com solventes, denominada extração líquido-líquido, envolve a distribuição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis. A separação do fármaco do material biológico se dá pela partição do mesmo entre as fases aquosa e orgânica e é influenciada pelo solvente extrator utilizado, pelo pH da fase aquosa e pelo volume do solvente extrator. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações [QUEIROZ *et al*, 2001].

Esta técnica é simples e extremamente útil para o isolamento de substâncias orgânicas e inorgânicas, além de proporcionar a desnaturação das proteínas da amostra biológica, minimizando os danos na coluna cromatográfica. Há um grande número de solventes disponíveis comercialmente, de alta pureza e ampla faixa de



---

seletividade para a extração de fármacos. Como desvantagens, essa técnica apresenta problemas no descarte dos resíduos dos solventes orgânicos de elevada toxicidade, necessita de volumes relativamente grandes de amostra e solventes, pode ocorrer perda de analitos com elevada solubilidade em água, entre outros.

O método de extração líquido-líquido foi aplicado para isolar os metabólitos DCQ e DHCQ a partir da matriz de plasma humano diluído e de frações microsossomais isoladas de fígado de ratos e de camundongos. Devido ao caráter básico da HCQ e de seus metabólitos, as amostras foram alcalinizadas (pH 10,0) com 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 5 mol L<sup>-1</sup> (Figura 6).

O procedimento de extração resultou em eficiente recuperação e eliminou possíveis interferentes endógenos da matriz. Os resultados serão apresentados a seguir, juntamente com os demais resultados da validação do método.

#### **4.1.3. Validação do método**

O desenvolvimento de métodos para análise de fármacos em fluidos biológicos requer a completa validação dos procedimentos. Essa validação é feita após todas as condições em que a análise será feita terem sido estabelecidas, avaliando parâmetros como recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade [CAUSON, 1997; HARTMANN *et al*, 1998; FDA, 2001]. Nesse estudo, a seletividade foi avaliada apenas com relação a interferentes presentes na matriz. A interferência de outros compostos como fármacos não foi avaliada, visto que o método não é proposto para estudos clínicos, mas para análise de amostras de plasma ou

---

frações microsossomais isoladas de fígados de ratos e camundongos fortificadas com o fármaco ou metabólitos de interesse.

#### 4.1.3.1. *Calibração e linearidade*

A linearidade de um método é avaliada a partir de curvas analíticas, as quais definem a relação entre a concentração do analito e a resposta obtida na análise. As curvas são construídas usando, no mínimo, cinco valores de concentração. Cada padrão é preparado pela adição de um volume determinado de solução-estoque do fármaco ou dos metabólitos a uma alíquota da matriz. [BRESSOLLE *et al*, 1996a].

Utilizou-se concentração plasmática dos metabólitos no intervalo de 125 - 5000 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero do DCQ e 125 – 2500 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero do DHCQ. Foram construídas curvas analíticas das concentrações dos enantiômeros (x) *versus* as áreas dos picos (y) para o metabólito DCQ e concentrações dos enantiômeros (x) *versus* as alturas medidas manualmente (y) para o metabólito DHCQ. A regressão linear foi utilizada para a determinação das concentrações dos enantiômeros nas amostras.

As Figuras 11 e 12 apresentam as curvas analíticas para os enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ, respectivamente. Os coeficientes de correlação obtidos indicam que o método atende aos critérios estabelecidos para métodos usados em análise de fármacos em amostras biológicas [CAUSON, 1997].

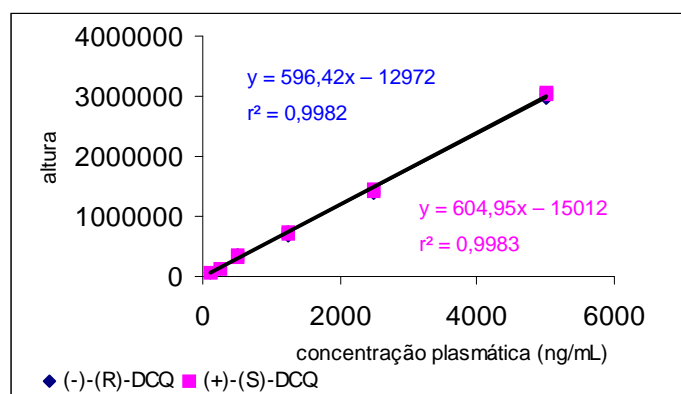


Figura 11: Curvas analíticas para os enantiômeros do metabólito DCQ, no intervalo de concentração plasmática de 50 – 5000 ng mL<sup>-1</sup>.

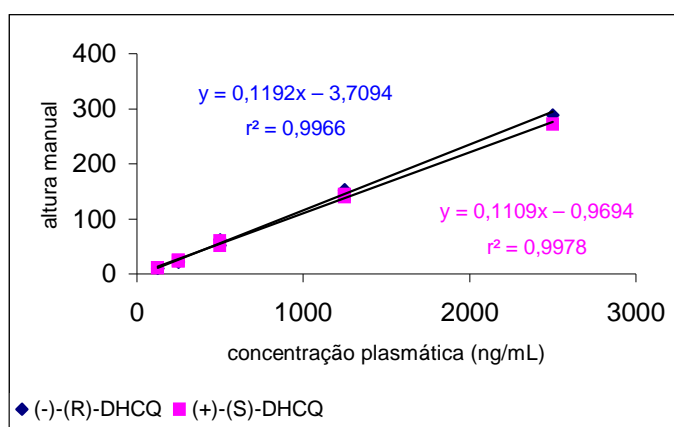


Figura 12: Curvas analíticas para os enantiômeros do metabólito DHCQ, no intervalo de concentração plasmática de 125 – 2500 ng mL<sup>-1</sup>.

#### 4.1.3.2. Recuperação

A percentagem de recuperação é estabelecida pela comparação das respostas de amostras extraídas, fortificadas com concentrações baixa, média e alta dos analitos

com aquelas de padrões não submetidos ao procedimento de extração. Para a recuperação de analitos em amostras biológicas, o coeficiente de variação não deve exceder 15% [CAUSON, 1997; SHAH *et al*, 1992].

Na Tabela 10 encontram-se os resultados referentes à recuperação dos enantiômeros para os dois metabólitos analisados. Verifica-se que embora o procedimento de extração tenha resultado em recuperações relativamente baixas, a reprodutibilidade foi adequada. Baixas recuperações não induzem a erros no método, visto que a concentração dos analitos nas amostras são calculadas com base em curvas analíticas também submetidas ao procedimento de extração.

Tabela 10: Recuperação do método para a análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ.

	125 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>	1250 ng mL <sup>-1</sup>	2500 ng mL <sup>-1</sup>
(-)-(R)-DCQ	73,9	67,7	64,1	64,2
CV (%)	3,0	4,3	2,6	0,9
(+)-(S)-DCQ	75,1	67,6	63,6	64,3
CV (%)	2,1	3,7	2,8	0,6
(-)-(R)-DHCQ	-	70,4	58,8	59,5
CV (%)	-	9,7	7,2	5,9
(+)-(S)-DHCQ	-	68,2	59,8	58,5
CV (%)	-	14,5	7,5	6,5

CV, desvio padrão relativo; ( - ) não analisada.

#### 4.1.3.3. Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e corresponde ao grau de concordância entre análises individuais quando o método é aplicado repetidamente a várias alíquotas de uma amostra homogênea. A precisão é expressa matematicamente como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação). A precisão pode ser uma medida da reprodutibilidade ou da repetibilidade de um método analítico sob condições normais de operação. Neste contexto, reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios. Repetibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em um mesmo laboratório, por um curto período de tempo, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento [QUATTROCCHI *et al*, 1992].

A exatidão é uma medida do erro relativo e é definida como a concordância entre o valor medido e o valor real [CAUSON, 1997].

Os parâmetros precisão e exatidão foram obtidos analisando-se replicatas de amostras fortificadas com concentrações conhecidas dos metabólitos da HCQ. As precisões e exatidões intra e interensaios encontram-se na Tabela 11, na qual observa-se que todos os valores de CV e erro foram inferiores a 15% para as amostras analisadas, comprovando que o método atende aos critérios estabelecidos na literatura [BRESSOLE *et al*, 1996; CAUSON, 1997].

Não foi efetuado um teste completo de estabilidade, mas os resultados obtidos nos estudos interensaios mostram que as amostras podem ser estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por, pelo menos, 10 dias.

Tabela 11: Precisão e exatidão na análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ

	Intra-ensaio ( $n = 5$ )			Interensaios ( $n = 3$ )		
	Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	CV (%)	E (%)	Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	CV (%)	E (%)
<b><math>250 \text{ ng mL}^{-1}</math></b>						
(-)-(R)-DCQ	237,30	4,9	-5,1	265,52	9,1	6,2
(+)-(S)-DCQ	237,68	5,2	-4,9	264,73	8,6	5,9
(-)-(R)-DHCQ	215,38	2,9	-13,9	252,83	13,5	1,1
(+)-(S)-DHCQ	215,38	3,6	-13,9	261,34	14,6	4,5
<b><math>1250 \text{ ng mL}^{-1}</math></b>						
(-)-(R)-DCQ	1110,82	6,6	-11,1	1182,28	6,0	-5,4
(+)-(S)-DCQ	1108,82	6,9	-11,3	1183,62	6,3	-5,3
(-)-(R)-DHCQ	1150,77	6,9	-7,9	1295,10	10,9	3,6
(+)-(S)-DHCQ	1092,31	5,4	-12,6	1226,37	10,1	-1,9
<b><math>2500 \text{ ng mL}^{-1}</math></b>						
(-)-(R)-DCQ	2385,85	2,1	-4,6	2530,20	6,7	1,2
(+)-(S)-DCQ	2384,35	2,0	-4,6	2534,75	6,5	1,4
(-)-(R)-DHCQ	2523,08	3,9	0,9	2738,25	9,2	9,5
(+)-(S)-DHCQ	2375,38	4,3	-5,0	2567,83	9,6	2,7

$n$ , número de determinações; CV, desvio padrão relativo; E, exatidão expressa em % de erro relativo.

#### 4.1.3.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação, utilizado para medir a detectabilidade do método, é definido como a menor concentração que pode ser determinada com precisão e

exatidão aceitáveis, ou seja, CV e erro relativo abaixo de 20% [SHAH *et al*, 1992]. Este parâmetro, determinado a partir de amostras de plasma fortificadas e extraídas, foi de 50 ng mL<sup>-1</sup> para os enantiômeros do DCQ e 125 ng mL<sup>-1</sup> para os enantiômeros do DHCQ (Tabela 12).

Tabela 12: Limite de quantificação para a análise dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ

Enantiômeros	Conc. Teórica (ng mL <sup>-1</sup> )	Conc. Obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	Precisão (CV,%)	Exatidão (E,%)
(-)-(R)-DCQ	50	44	8.2	-11.6
(+)-(S)-DCQ	50	45	8.5	-10.0
(-)-(R)-DHCQ	125	105	1.3	-16.4
(+)-(S)-DHCQ	125	107	1.3	-14.3

CV, desvio padrão relativo; *r*, coeficiente de correlação; *E*, exatidão expressa em % de erro relativo

#### 4.1.4. Ordem de eluição

Iredale & Wainer desenvolveram um método para análise da HCQ e de seus metabólitos empregando a coluna Chiral AGP e fase móvel constituída por solução tampão fosfato de sódio 30 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0):etanol:acetonitrila 79:20:1 (v/v/v) contendo N,N dimetiloctilamina. Nessas condições cromatográficas, o enantiômero (-)-(R)-HCQ eluiu primeiro. Como não havia quantidades suficientes dos metabólitos resolvidos para a determinação de suas rotações ópticas, os autores assumiram que a

ordem de eluição enantiomérica dos metabólitos seria a mesma ordem de eluição dos enantiômeros da HCQ, visto que eles diferem somente nos grupos alquila da função amino da cadeia lateral [IREDALE & WAINER, 1992]. Sendo assim, utilizamos a coluna Chiral AGP e a mesma fase móvel para analisar os enantiômeros individuais da HCQ, DCQ e DHCQ, obtidos por separação semi-preparativa na coluna Chiralpak AD-RH. Com base nesse experimento foi possível determinar a seguinte ordem de eluição: (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-HCQ (3) e (+)-(S)-HCQ (4), (-)-(R)-DHCQ (5), (+)-(S)-DHCQ (6). Posteriormente, a ordem de eluição foi comprovada em um experimento de incubação dos enantiômeros isolados da HCQ com frações microsossomais de fígado de ratos e camundongos.

Em nosso trabalho, os enantiômeros puros da HCQ foram incubados com microsossomas de fígado de ratos e camundongos (estes resultados serão descritos e comentados no item 4.4). Foi observado que o (-)-(R)-HCQ produziu os enantiômeros (-)-(R)- dos metabólitos e o (+)-(S)-HCQ produziu os enantiômeros (+)-(S)- dos metabólitos. Pelos tempos de retenção de cada um deles, foi confirmada a ordem de eluição proposta por Iredale & Wainer.

## **4.2. Otimização da separação por CE**

A técnica de CE oferece algumas vantagens nas separações quirais, comparada com outras técnicas analíticas de separação: alta eficiência permitindo a resolução de pares de enantiômeros mesmo com reduzidos fatores de separação, facilidade de alteração da natureza e concentração do seletor quiral, possibilidade de usar misturas



---

de seletores quirais para otimizar a separação, baixo consumo de amostra e reagentes, permitindo o uso de seletores quirais caros [BLANCO & VALVERDE, 2003].

O método de análise desenvolvido por HPLC proporcionou a separação e a quantificação dos enantiômeros de apenas dois dos metabólitos da HCQ, ou seja, DCQ e DHCQ. Considerando que a resolução do terceiro metabólito, BDCQ, é importante para obter uma maior compreensão do metabolismo enantiosseletivo da HCQ, foi desenvolvido um método de análise por CE, o qual mostrou ser mais eficiente para a separação simultânea das oito espécies envolvidas no metabolismo do fármaco.

Vários parâmetros foram avaliados para a otimização da análise eletroforética quiral da HCQ e de seus metabólitos. Estes parâmetros serão discutidos a seguir.

#### **4.2.1. Dimensões do capilar**

A maioria dos capilares tem sido confeccionada em sílica fundida, um material que confere inércia química e elétrica ao capilar, bem como transparência na região UV-Vis, flexibilidade no manuseio e baixo custo, além de outras vantagens citadas no item 1.2.2.2, do capítulo Introdução. Esses capilares são cobertos com uma camada protetora de poliimida.

Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), o capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados, resultando em separações de alta eficiência, alta resolução e tempos de análise curtos [TAVARES, 1997].

---

O uso de capilares mais curtos pode reduzir significativamente o tempo de análise, porém, a resolução pode ser prejudicada, visto que há uma menor distância a ser percorrida pela amostra. Quanto ao diâmetro interno (d. i.), capilares com d. i. menor apresentam melhor eficiência por serem mais hábeis na dissipação do calor. Ao contrário, em capilares com d. i. maior percebe-se uma maior detectabilidade na análise, visto que o volume de amostra a ser injetado pode ser maior e o caminho óptico na detecção também é maior [ALTRIA, 1996].

Foram testados capilares de diferentes marcas e dimensões. Quanto ao diâmetro interno, foram testados capilares de 75 e 50  $\mu\text{m}$  de d. i. e quanto ao comprimento, capilares de 37 e 50 cm. Optou-se por trabalhar com o capilar de dimensões 50  $\mu\text{m}$  x 50 cm, o qual apresentou melhor eficiência e resolução em um tempo de análise relativamente curto. Foi feita uma janela de detecção, de aproximadamente 0,5 cm, com a queima do revestimento de poliimida, a partir de 8 cm da extremidade do capilar, o que proporcionou um comprimento efetivo de 42 cm.

#### **4.2.2. Condicionamento do capilar**

O condicionamento do capilar é um dos principais fatores que influenciam a reprodutibilidade na análise. O condicionamento com soluções alcalinas remove espécies adsorvidas na superfície interna do capilar e favorece a desprotonação dos grupos silanóis da superfície do capilar, de modo que seja estabelecido o EOF [HEIGER, 1992b].

O ciclo de lavagem foi sendo alterado durante o processo de otimização do método, até que se chegou às condições definitivas de condicionamento:

- solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 2 min
- água por 3 min
- solução do eletrólito de análise (contendo o seletor quiral) por 3 min

Este condicionamento foi aplicado entre todas as injeções. No início do dia, o capilar era lavado com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 10 min e com água por 10 min. No final do dia, o capilar era lavado com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 4 min e com água por 4 min e estocado em água.

#### **4.2.3. Condições de injeção**

Foram testadas as injeções hidrodinâmica e eletrocínética. Obteve-se separação dos picos somente com a injeção hidrodinâmica. Neste tipo de injeção é aplicada pressão por um determinado tempo e um volume proporcional de amostra é introduzido dentro do capilar. A melhor resolução foi obtida com uma pressão de 50 mbar por 15 segundos.

#### **4.2.4. Composição, concentração e pH da solução de eletrólitos**

A escolha da solução de eletrólitos, com concentração e pH otimizados, é um dos fatores determinantes para o sucesso de uma separação por CE. O EOF é sensível a variações de pH, por isso, um dos requisitos para a escolha da solução de eletrólitos é que apresente boa capacidade tamponante no pH selecionado. Além disso, deve apresentar baixa absorvância no comprimento de onda de detecção e baixa mobilidade (íons grandes, pouco carregados), a fim de minimizar a geração de corrente (efeito Joule) [HEIGER, 1992a]. A escolha da solução de eletrólitos também influencia a forma

---

da banda, ou seja, soluções com mobilidade semelhante à mobilidade do soluto previnem distorções no perfil da banda e minimizam seu alargamento [TAVARES, 1997]. Eletrólitos biológicos como o tris(hidroximetil)aminometano que, em geral, possuem íons grandes, de baixa mobilidade, podem ser usados em altas concentrações, sem a desvantagem de gerar calor excessivo no capilar. Já eletrólitos inorgânicos, como fosfato e borato, não devem ser usados em altas concentrações devido ao aquecimento no interior do capilar [ROGAN & ALTRIA, 1995]. Baixas concentrações de eletrólitos podem, por outro lado, favorecer a adsorção de certos solutos na parede do capilar, ocasionando alargamento e distorção das bandas [TAVARES, 1997].

A HCQ e seus metabólitos são fármacos básicos, portanto, protonados em pH baixo. Neste caso, o EOF seria praticamente inexistente, devido à baixa ionização dos grupos silanóis. Portanto, a migração dos enantiômeros em direção ao cátodo dependeria somente de sua mobilidade eletroforética. Já em pH elevado, os solutos não estão carregados positivamente, mas como nesse pH o EOF é alto, os solutos são levados em direção ao cátodo pelo EOF. Somente esse fator não seria suficiente para determinar diferentes tempos de migração para os enantiômeros, mas como será usado seletor quiral para a separação, as diferentes constantes de estabilidade dos complexos formados entre cada enantiômero e o seletor quiral permitirão a separação. Este assunto será discutido com maior profundidade no próximo item.

Foram testadas diferentes soluções de eletrólitos (descritas na Tabela 2), com diferentes concentrações e pH, e obteve-se a melhor separação usando o eletrólito tris(hidroximetil)aminometano  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 9,0.

#### 4.2.5. *Seletor quiral*

Em função dos enantiômeros de uma determinada mistura racêmica apresentarem mesma mobilidade, adiciona-se um seletor quiral à solução de eletrólitos. Devido à diferente interação dos enantiômeros com o seletor quiral, diferentes mobilidades são obtidas. Enantiômeros carregados podem ser separados usando seletor quiral neutro, enquanto que para a separação de enantiômeros neutros, seletores quirais carregados são necessários [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998].

O uso de CDs como seletores quirais aproxima-se de 80% em relação ao demais [BLANCO & VALVERDE, 2003]. As CDs apresentam uma cavidade hidrofóbica, apta para formar complexos de inclusão com os enantiômeros, e uma superfície externa hidrofílica. A formação dos complexos de inclusão entre os enantiômeros e as CDs é fortemente influenciada não somente pela interação hidrofóbica na cavidade mas, também, pela interação entre os grupos substituintes na extremidade do anel e substituintes do centro estereogênico dos enantiômeros [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998]. Além disso, para que ocorra a complexação, a afinidade do enantiômero pela cavidade da CD deve ser maior do que por outros componentes presentes (solvente, por exemplo). As interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio podem ocorrer independentemente ou em combinação no processo de complexação e a estequiometria dos complexos formados pode variar [BRESSOLLE *et al*, 1996b].

---

A separação dos enantiômeros baseia-se na formação dos complexos, que são diastereoisômeros transitórios, e na diferença entre as constantes de estabilidade destes complexos.

Os testes de seletores quirais iniciaram-se com a HP- $\beta$ -CD em diferentes concentrações, em solução tampão tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 3,0. Quando o potencial é aplicado, os solutos protonados migram em direção ao cátodo e a CD, sem carga, migra na velocidade do EOF. O enantiômero que formar o complexo de inclusão mais estável com a CD terá um tempo de migração maior. Nestas condições, não houve separação satisfatória.

As Tabelas 2, 3 e 4, do item 3.2.5, apresentam todas as condições em que os seletores quirais foram testados. Uma melhora na separação foi obtida com solução tampão fosfato, pH 9,0, contendo S- $\beta$ -CD 0,5%. Neste caso, a CD está carregada negativamente e o soluto sem carga. Com a aplicação de potencial, a CD tende a migrar em direção ao ânodo, o soluto migra na velocidade do EOF e o complexo de inclusão do enantiômero com a CD tende a migrar em um tempo maior.

O uso de misturas de seletores quirais na mesma solução de eletrólitos tem-se tornado uma alternativa para os métodos de separação quiral [VERLEYSSEN & SANDRA, 1998]. A literatura descreve, para a separação quiral da CQ e de seu metabólito DCQ, uma mistura de dois seletores quirais, HP- $\beta$ -CD e CM- $\beta$ -CD [MÜLLER & BLASCHKE, 2000]. A próxima etapa nos testes de seletores quirais foi testar uma solução tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> com a mistura de S- $\beta$ -CD 0,5% e HP- $\beta$ -CD 20 mmol L<sup>-1</sup> e com a mistura de S- $\beta$ -CD 1% e HP- $\beta$ -CD 30 mmol L<sup>-1</sup>, em pH 9,0. A

---

separação apresentou melhora, porém, ainda não era totalmente satisfatória. Descartou-se a possibilidade de aumentar a força iônica da solução de eletrólitos (a fim de minimizar uma possível adsorção dos solutos nas paredes do capilar ou aumentar a reprodutibilidade do EOF) visto que a corrente gerada poderia ser muito alta (em tampão 50 mmol L<sup>-1</sup> a corrente gerada era de 40 μA). Optou-se por utilizar solução tris(hidroximetil)aminometano, um eletrólito biológico que apresenta baixa condutividade gerando, portanto, menor corrente no interior do capilar. O eletrólito foi utilizado na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0, com uma mistura de S-β-CD 1% e HP-β-CD 30 mmol L<sup>-1</sup>, o que resultou na separação adequada das oito espécies.

#### **4.2.6. *Voltagem aplicada***

A voltagem aplicada afeta tanto a velocidade como a eficiência da separação. O uso de altas voltagens reduz o tempo de análise, para compostos que apresentam tempos de migração elevados. Porém, altas voltagens podem levar a perdas na resolução, devido ao efeito Joule. Este efeito ocorre em função da passagem da corrente elétrica, produzindo espalhamento da zona do soluto que está sendo separado [ALTRIA, 1996]. A otimização da voltagem, juntamente com os demais parâmetros envolvidos na análise, deve visar um valor de corrente aceitável. A voltagem escolhida neste estudo, de 13 kV, gerou uma corrente entre 14-16 μA.

#### **4.2.7. *Temperatura***

Variações na temperatura de análise alteram a viscosidade do meio, o EOF e o tempo de migração. Um aumento na temperatura provoca diminuição na viscosidade e,

---

conseqüentemente, aumento da mobilidade eletroforética e do EOF. Como conseqüência final, tem-se a diminuição nos tempos de migração. Em CE, a concentração da amostra e o tempo de migração afetam diretamente a área do pico. Se não houver um controle de temperatura durante a análise, a variação na temperatura levará a uma baixa precisão nos resultados. Além disso, com a variação da viscosidade, a quantidade de solução que entrará no capilar também sofrerá variação. Esse controle de temperatura é importante não só para o capilar, mas também para os frascos que contém a amostra e as soluções de eletrólitos [ALTRIA, 1996]. Foram testadas temperaturas de 15, 20 e 25 °C, sendo que com a temperatura de 20 °C obteve-se os melhores resultados.

#### **4.2.8. Solução de dissolução**

Em CE, a escolha da solução de dissolução da amostra pode afetar significativamente a separação eletroforética. O uso de uma solução de dissolução com menor condutividade que a solução eletrolítica de análise proporciona a injeção de maior quantidade do soluto, sem que haja alargamento das bandas. Este procedimento, denominado empilhamento da zona da amostra (do inglês, *sample stacking*), permite aumentar a detectabilidade da técnica de CE, a qual é menor em relação a outras técnicas analíticas, em função do pequeno volume de amostra injetado. Solventes orgânicos e misturas aquosa-orgânicas são empregadas para compostos de baixa solubilidade. Entretanto, a presença de solventes orgânicos na solução da amostra pode causar grande influência na separação [KELLY *et al*, 1998]. Foram testadas as seguintes soluções de dissolução: somente solução tampão



tris(hidroximetil)aminometano diluído 10 vezes ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), em diferentes volumes e pH, mistura de tris-acetonitrila, acetonitrila e solução de uréia. Destas soluções, a que proporcionou melhores resultados foi  $50 \text{ } \mu\text{L}$  de solução tampão tris(hidroximetil)aminometano  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 2,0. A utilização de acetonitrila pura não proporcionou separação eletroforética e a solução de uréia e a mistura de tampão e acetonitrila produziram picos alargados.

#### 4.2.9. *Condições de separação otimizadas e ordem de migração*

Após o estudo dos parâmetros que influenciam a separação eletroforética, chegou-se à condição otimizada de análise, a qual proporcionou a melhor separação (Figura 13).

- **Comprimento do capilar:** 50 cm
- **Diâmetro interno do capilar:**  $50 \text{ } \mu\text{m}$
- **Solução de análise:** tris(hidroximetil)aminometano  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 9,0 contendo 1% (m/v) de S- $\beta$ -CD e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de HP- $\beta$ -CD
- **Temperatura:**  $20 \text{ } ^\circ\text{C}$
- **Voltagem:** 13 kV
- **Injeção:** hidrodinâmica, 50 mbar durante 15 segundos
- **Solução de dissolução:**  $50 \text{ } \mu\text{L}$  de tris(hidroximetil)aminometano  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 2,0 (submetida à partição com  $70 \text{ } \mu\text{L}$  de hexano)

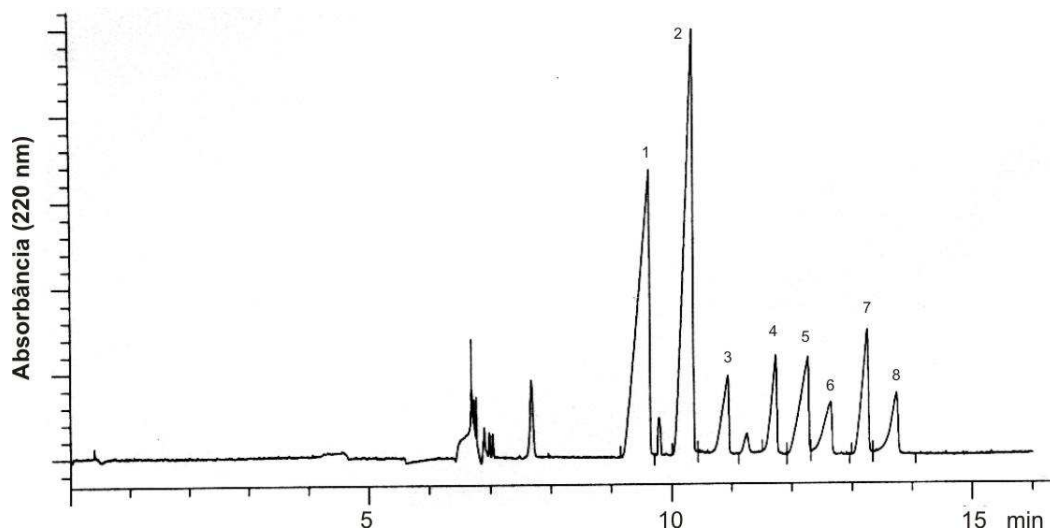


Figura 13: Eletroferograma mostrando a resolução da HCQ e de seus metabólitos em plasma diluído, fortificado com  $2000 \text{ ng mL}^{-1}$  dos enantiômeros: (-)-(R)-HCQ (1) e (+)-(S)-HCQ (2), (-)-(R)-DHCQ (3) e (+)-(S)-DHCQ (4), (+)-(S)-DCQ (5), (-)-(R)-BDCQ (6), (-)-(R)-DCQ (7) e (+)-(S)-BDCQ (8).

A eletrólise da solução de eletrólitos pode alterar seu pH e, conseqüentemente, alterar o EOF, afetando os tempos de migração e a seletividade e, em última instância, a reprodutibilidade nas separações [MACKA *et al*, 1998]. Para prevenir a eletrólise, os reservatórios contendo as soluções de eletrólitos foram substituídos após três análises consecutivas. Os reservatórios de água e de solução de NaOH também foram substituídos, a fim de evitar alterações no condicionamento do capilar.

A ordem de migração foi estabelecida por comparação com os resultados obtidos no estudo *in vitro* de metabolismo, analisado pelo método CE desenvolvido e pelo método HPLC previamente descrito. A análise demonstrou que o primeiro pico eluído corresponde ao (-)-(R)-enantiômero e o segundo pico corresponde ao (+)-(S)-

---

enantiômero para HCQ, DHCQ e BDCQ, enquanto que, para o metabólito DCQ a ordem de migração foi invertida.

#### **4.2.10. Preparação das amostras**

O método de extração líquido-líquido foi aplicado para isolar os metabólitos DCQ e DHCQ a partir da matriz de plasma humano diluído e de frações microsossomais isoladas de fígado de camundongos. Os analitos foram extraídos usando tolueno como solvente extrator e NaCl foi também adicionado para aumentar a recuperação dos metabólitos (Figura 7). O sal, adicionado na fase aquosa, aumenta a força iônica e a polaridade desta fase, forçando a transferência do analito para a fase orgânica [McDOWALL, 1989]. Após os resíduos obtidos no procedimento de extração terem sido dissolvidos na solução de dissolução (tampão tris(hidroximetil)aminometano 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 2, a amostra apresentou uma aparência turva devido à presença de lipídeos que foram extraídos pelo solvente orgânico. Esta interferência foi eliminada efetuando-se uma partição com hexano. Assim, o procedimento foi efetivo na eliminação de interferentes endógenos da matriz, resultando em uma linha de base estável.

O procedimento de extração resultou em eficiente recuperação para os enantiômeros da HCQ e dos metabólitos DCQ a DHCQ. Os resultados serão apresentados a seguir, juntamente com os demais resultados da validação do método.

#### **4.2.11. Validação do método**

O método desenvolvido foi validado avaliando-se os parâmetros linearidade, recuperação, precisão, exatidão e limite de quantificação. A seletividade não foi avaliada, visto que o método não é proposto para estudos clínicos, mas para análise de amostras de plasma ou frações microssomais fortificadas com o fármaco ou metabólitos de interesse.

As análises de regressão linear foram desenvolvidas relacionando-se a razão área do pico/tempo de migração (x) com a concentração dos enantiômeros (y).

##### **4.2.11.1. Calibração e linearidade**

Utilizou-se concentração plasmática no intervalo de 625 - 10000 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero da HCQ e 125 - 2000 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero dos metabólitos. A regressão linear foi utilizada para a determinação das concentrações dos enantiômeros nas amostras.

As Figuras 14 - 17 apresentam as curvas analíticas para os enantiômeros dos quatro analitos.

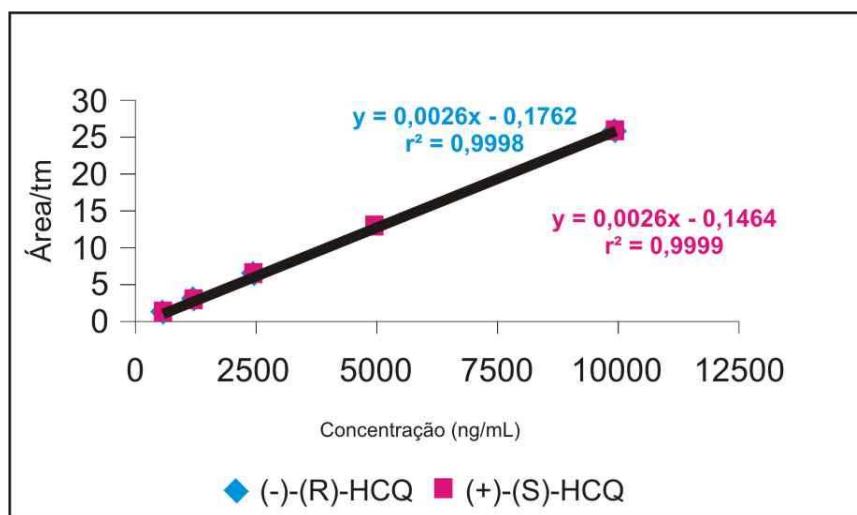


Figura 14: Curva analítica para os enantiômeros da HCQ, no intervalo de concentração de 625 – 10000 ng mL<sup>-1</sup>.

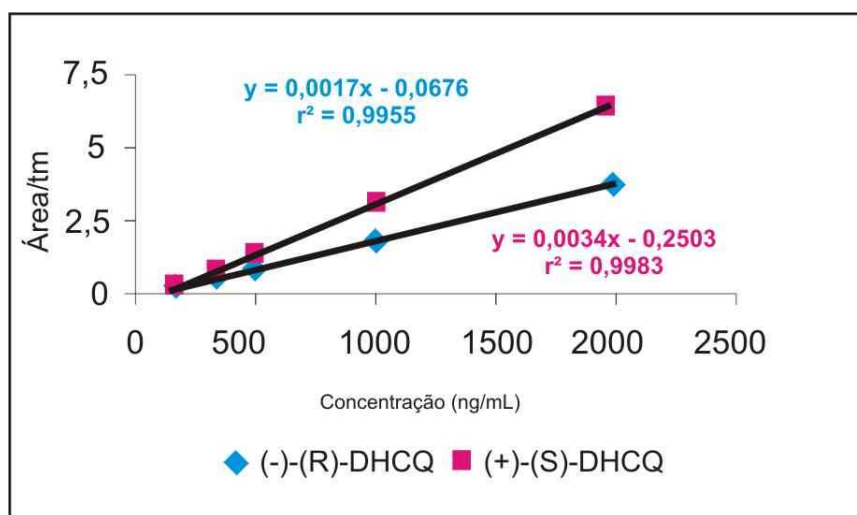


Figura 15: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito DHCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>.

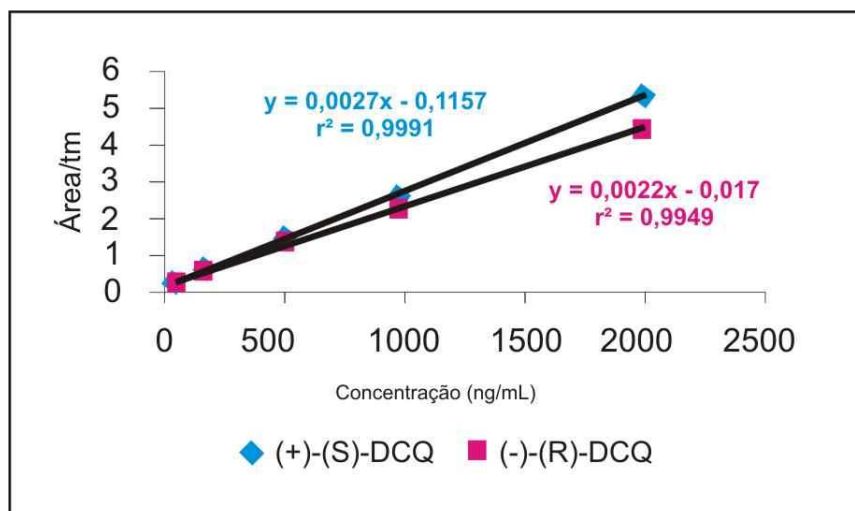


Figura 16: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito DCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>.

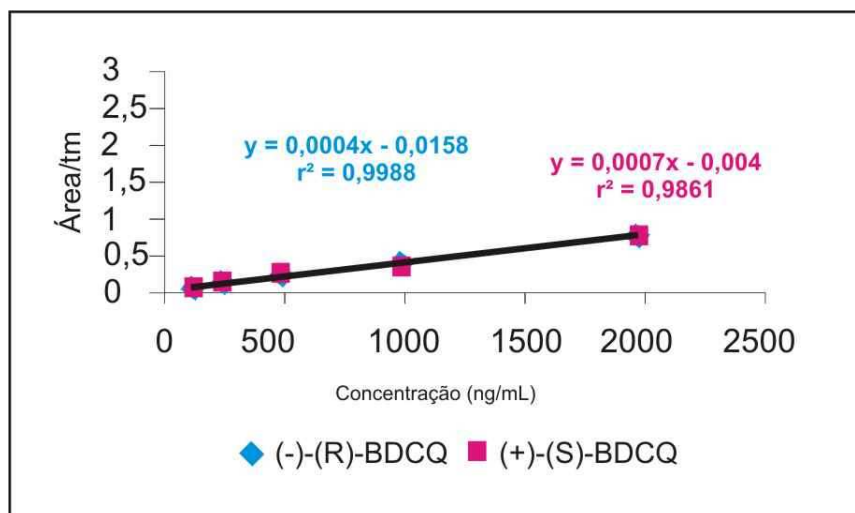


Figura 17: Curva analítica para os enantiômeros do metabólito BDCQ, no intervalo de concentração de 125 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>.

## 4.2.11.2. Recuperação

Na Tabela 13 encontram-se os resultados referentes à recuperação do método. Os coeficientes de variação abaixo de 15% mostram a reprodutibilidade no procedimento de extração.

Tabela 13: Recuperação do método para análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos DHCQ, DCQ e BDCQ.

	625 ng mL <sup>-1</sup>	1250 ng mL <sup>-1</sup>	2500 ng mL <sup>-1</sup>	5000 ng mL <sup>-1</sup>	10000 ng mL <sup>-1</sup>
(-)-(R)-HCQ	100,0	96,2	81,0	89,7	83,7
CV (%)	9,6	9,7	14,8	8,0	15,0
(+)-(S)-HCQ	100,0	96,8	81,4	89,8	83,7
CV (%)	12,1	10,0	14,7	8,4	14,7
	125 ng mL <sup>-1</sup>	250 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>	1000 ng mL <sup>-1</sup>	5000 ng mL <sup>-1</sup>
(-)-(R)-DHCQ	46,8	59,2	57,1	56,0	61,0
CV (%)	11,5	14,0	13,8	10,8	9,8
(+)-(S)-DHCQ	48,7	63,4	52,8	57,1	62,7
CV (%)	9,3	14,6	10,1	11,4	14,0
(-)-(R)-DCQ	78,4	97,5	75,0	84,3	87,7
CV (%)	7,0	9,6	8,1	4,2	14,9
(+)-(S)-DCQ	78,2	100,0	79,7	99,3	90,3
CV (%)	8,4	13,8	6,0	1,6	12,5
(-)-(R)-BDCQ	23,3	24,5	27,2	23,4	26,4
CV (%)	14,8	11,5	10,1	9,7	12,1
(+)-(S)-BDCQ	23,1	27,3	23,0	18,6	24,5
CV (%)	13,6	14,6	12,9	9,8	10,1

CV, desvio padrão relativo

## 4.2.11.3. Precisão e exatidão

Os parâmetros precisão e exatidão foram obtidos analisando-se replicatas de amostras fortificadas com concentrações conhecidas da HCQ e de seus metabólitos. As precisões intra e interensaios encontram-se nas Tabelas 14 e 15. Mesmo sem o uso de um padrão interno, o método mostrou precisão aceitável para todas as concentrações avaliadas.

Tabela 14: Precisão e exatidão intra-ensaio ( $n=5$ ) na análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos.

HCQ			Metabólitos						
Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	(-)(R)-HCQ	(+)(S)-HCQ	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	(-)(R)-DHCQ	(+)(S)-DHCQ	(-)(R)-DCQ	(+)(S)-DCQ	(-)(R)-BDCQ	(+)(S)-BDCQ
1875	2130,66	2456,86	375	424,55	431,30	341,17	368,12	322,32	324,88
CV%	6,8	3,2	CV%	7,8	5,2	14,9	15,0	10,8	4,9
E%	+13,6	+15,0	E%	+13,2	+15,0	+9,0	-1,8	-14,0	+13,4
5000	4289,41	4423,29	1000	882,67	861,47	957,71	934,06	1056,18	946,56
CV%	10,9	12,7	CV%	11,9	13,9	4,4	13,2	10,2	15,0
E%	-14,2	-11,5	E%	-11,7	-13,8	-4,2	-6,6	+5,6	-5,3
8750	9110,44	9657,72	1750	1925,54	1822,67	1852,5	1915,86	1516,81	1532,41
CV%	5,2	6,0	CV%	12,4	9,6	5,9	5,9	4,8	11,7
E%	+4,1	+10,4	E%	+10,0	+4,1	+5,8	+9,5	-13,3	-12,4



Tabela 15: Precisão e exatidão interensaios ( $n=3$  dias) na análise dos enantiômeros da HCQ e de seus metabólitos.

HCQ			Metabólitos						
Conc (ng mL <sup>-1</sup> )	(-)-(R)-HCQ	(+)-(S)-HCQ	Conc (ng mL <sup>-1</sup> )	(-)-(R)-DHCQ	(+)-(S)-DHCQ	(-)-(R)-DCQ	(+)-(S)-DCQ	(R)-(-)-BDCQ	(+)-(S)-BDCQ
1875	1861,99	1872,31	375	416,54	422,54	373,79	380,42	366,97	384,34
CV%	9,1	8,6	CV%	9,6	9,9	8,6	8,7	12,8	10,9
E%	-0,7	-0,1	E%	+11,1	+12,8	-0,3	+1,4	-2,1	+2,5
5000	4451,56	4615,10	1000	1014,34	1024,60	1020,94	949,41	1078,08	966,57
CV%	9,7	12,1	CV%	9,1	11,9	8,7	12,6	11,9	12,8
E%	-8,9	-7,7	E%	+1,4	+2,5	+2,1	-5,1	+7,8	-3,3
8750	8596,22	8757,68	1750	1860,62	1752,13	1796,57	1629,78	1512,75	1612,06
CV%	8,4	5,8	CV%	14,1	12,9	7,5	6,4	9,4	13,5
E%	-1,8	+0,1	E%	+6,3	+0,1	+2,7	-6,9	-13,6	-7,9

#### 4.2.11.4. Limite de quantificação

Este parâmetro, determinado a partir de amostras de plasma fortificadas e extraídas, foi de 125 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero dos metabólitos. Observa-se para esse parâmetro, valores de CV e erro relativo abaixo do valor máximo permitido (Tabela 16) que é de no máximo 20% [BRESSOLLE *et al*, 1996a].

Tabela 16: Limite de quantificação para a análise dos enantiômeros dos metabólitos da HCQ.

Enantiômeros	Conc. teórica (ng mL <sup>-1</sup> )	Conc. obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	Precisão (CV, %)	Exatidão (E, %)
(-)-(R)-DHCQ	125	123.0	13.0	-1.6
(+)-(S)-DHCQ	125	144.4	14.4	+15.6
(-)-(R)-DCQ	125	110.0	12.6	-12.0
(+)-(S)-DCQ	125	106.5	14.4	-14.8
(-)-(R)-BDCQ	125	100.1	14.9	-19.9
(+)-(S)-BDCQ	125	137.8	12.2	+10.2

### **4.3. Otimização do estudo *in vitro* de metabolismo e aplicação dos métodos**

A otimização do estudo de metabolismo foi desenvolvida usando frações microssomais de fígado de ratos Winstar. Após as condições de incubação terem sido estabelecidas, o estudo *in vitro* de metabolismo foi aplicado na incubação da HCQ com frações microssomais de fígado de ratos e de camundongos Balb-C. Os animais, após serem submetidos ao procedimento de perfusão, tiveram seus fígados extraídos e a partir dos fígados extraídos, foram isoladas as frações microssomais.

Todas as etapas da otimização foram desenvolvidas utilizando o método por HPLC. As concentrações dos enantiômeros dos metabólitos formados foram calculadas empregando-se curvas analíticas obtidas de duplicatas de amostras de plasma diluído fortificadas com as soluções-padrão dos metabólitos, nas concentrações de 250, 500,

1250, 2500 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero, após terem sido submetidas ao procedimento de extração.

#### 4.3.1. Condições de incubação

##### 4.3.1.1. Tempo de incubação

Foram incubadas frações microsossomais, em triplicata, nos tempos de 30, 90 e 180 minutos, fixando o volume da fração microsossomal em 500 µL e a concentração da HCQ em 1000 µg mL<sup>-1</sup>. A dosagem de proteínas para a fração microsossomal nesta etapa foi de 37,5 mg mL<sup>-1</sup>, efetuada utilizando o método do biureto, como descrito no item 3.3.5.

As Figuras 18 e 19 ilustram a relação entre a concentração dos enantiômeros formados nos três tempos de incubação, para os metabólitos DCQ e DHCQ, respectivamente.

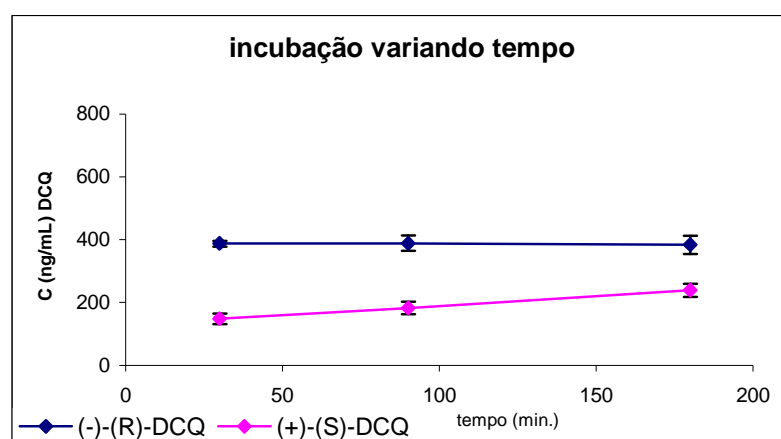


Figura 18: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função do tempo de incubação.

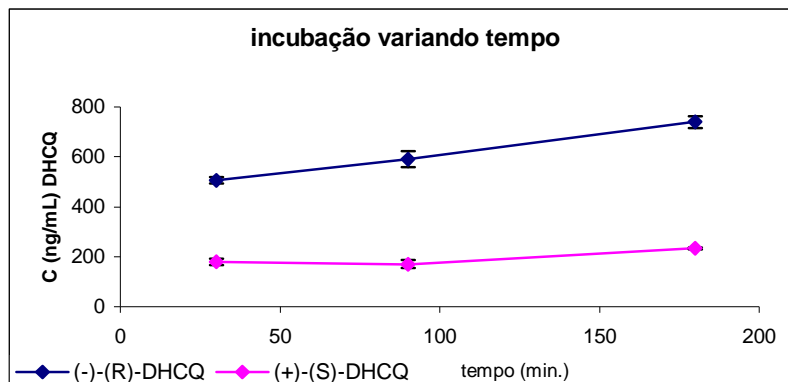


Figura 19: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função do tempo de incubação.

Segundo o teste de “Tukey” aplicado, não há uma diferença estatisticamente significativa para as concentrações obtidas nos três diferentes tempos de incubação. De qualquer forma, optou-se pelo tempo de incubação de 180 min, no qual houve aparentemente maior formação dos metabólitos, com estereosseletividade no metabolismo.

#### 4.3.1.2. Concentração de HCQ racêmica

Foram incubadas frações microssomais, em triplicata, com 200, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de HCQ racêmica, fixando o tempo de incubação em 180 min e o volume da fração microssomal em 500  $\mu\text{L}$ . A dosagem de proteínas para a fração microssomal nesta etapa foi de 53,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .

As Figuras 20 e 21 ilustram a relação entre a concentração dos enantiômeros formados com as três diferentes concentrações do fármaco, para os metabólitos DCQ e DHCQ, respectivamente.

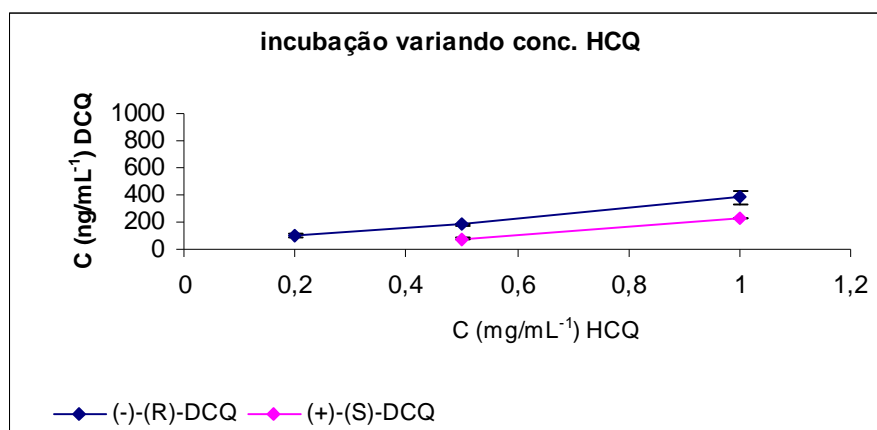


Figura 20: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função da concentração de HCQ.

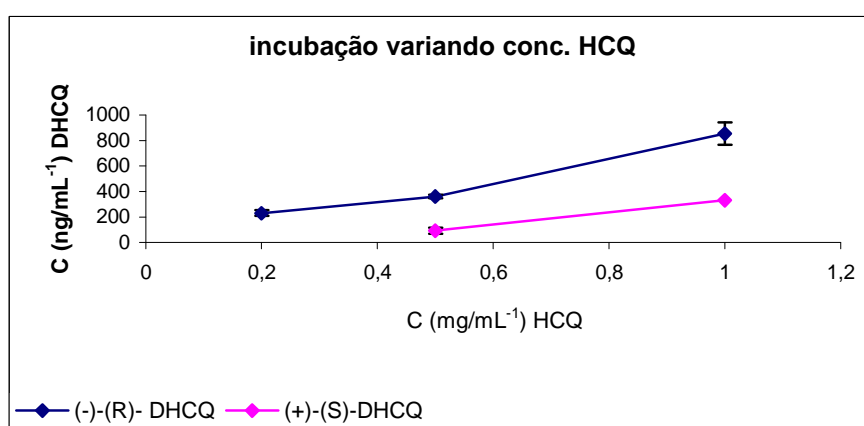


Figura 21: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função da concentração de HCQ.

Segundo o teste de “Tukey” aplicado, há uma diferença estatisticamente significativa para as concentrações obtidas nas três diferentes concentrações de HCQ.

Assim, optou-se pela concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a qual produziu maior quantidade de metabólitos, com maior estereosseletividade no metabolismo.

#### 4.3.1.3. Volume da fração microsomal

Quatro diferentes volumes de frações microsomais, 200, 300, 500 e  $1000 \mu\text{L}$ , em triplicata, foram incubados, fixando o tempo de incubação em 180 min e a concentração de HCQ em  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A dosagem de proteínas para a fração microsomal nesta etapa foi de  $49,2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

As Figuras 22 e 23 ilustram a relação entre a concentração dos enantiômeros formados nos quatro tempos de incubação, para os metabólitos DCQ e DHCQ, respectivamente.

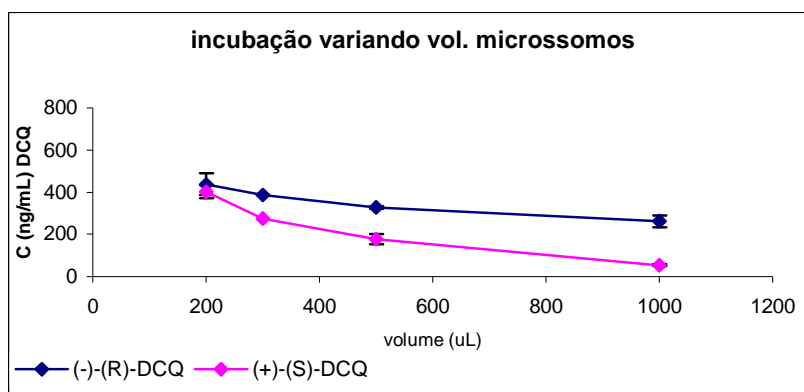


Figura 22: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DCQ em função do volume da fração microsomal.

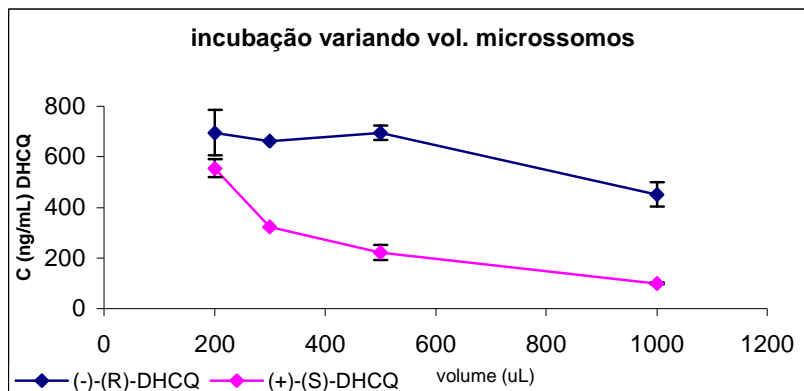


Figura 23: Variação da concentração dos enantiômeros do metabólito DHCQ em função do volume da fração microsomal.

Segundo o teste de "Tukey" aplicado, há uma diferença estatisticamente significativa para as concentrações obtidas para os quatro diferentes volumes de fração microsomal. Optou-se pelo volume de 500  $\mu\text{L}$  de fração microsomal, mesmo que neste volume tenha sido produzida uma concentração intermediária dos metabólitos formados. Os volumes de 200 e 300  $\mu\text{L}$ , apesar de terem produzido maiores quantidades de metabólitos, apresentaram menor estereosseletividade no metabolismo. Uma possível explicação para a diminuição da concentração dos metabólitos formados à medida que se aumentava o volume da fração microsomal é a diferença na razão fração microsomal/cofadores (utilizados na solução de incubação NRS). À medida que o volume de fração microsomal aumenta, a quantidade disponível dos cofadores pode não ter sido suficiente para aumentar a metabolização da HCQ.

A Tabela 17 mostra as concentrações médias obtidas para cada enantiômero formado e os respectivos coeficientes de variação, nas três etapas da otimização: A – tempo de incubação, B – concentração de HCQ e C – volume da fração microsomal.

Tabela 17: Concentrações médias de cada enantiômero produzido nas três etapas de otimização.

	(-)-(R)-DCQ		(+)-(S)-DCQ		(-)-(R)-DHCQ		(+)-(S)-DHCQ	
	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	CV (%)	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	CV (%)	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	CV (%)	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	CV (%)
<b>A<sub>30</sub></b>	387,44	2,3	148,16	11,5	505,94	2,3	179,80	7,0
<b>A<sub>90</sub></b>	388,63	6,5	182,12	10,6	589,95	5,4	169,71	9,5
<b>A<sub>180</sub></b>	<b>383,56</b>	<b>7,4</b>	<b>238,93</b>	<b>8,9</b>	<b>739,73</b>	<b>3,1</b>	<b>233,33</b>	<b>1,8</b>
<b>B<sub>200</sub></b>	103,59	11,48	*	*	230,77	9,43	*	*
<b>B<sub>500</sub></b>	179,46	2,2	73,60	7,4	361,54	3,7	92,8	10,8
<b>B<sub>1000</sub></b>	<b>378,72</b>	<b>11,9</b>	<b>229,45</b>	<b>1,1</b>	<b>853,85</b>	<b>10,0</b>	<b>330,44</b>	<b>7,4</b>
<b>C<sub>200</sub></b>	438,26	12,1	402,87	7,9	695,24	12,9	554,84	6,6
<b>C<sub>300</sub></b>	386,43	12,0	274,69	8,7	662,86	8,2	322,58	13,0
<b>C<sub>500</sub></b>	<b>327,49</b>	<b>2,2</b>	<b>176,67</b>	<b>13,3</b>	<b>695,24</b>	<b>4,1</b>	<b>221,50</b>	<b>13,1</b>
<b>C<sub>1000</sub></b>	261,43	10,9	54,12	10,0	451,43	10,8	98,92	3,8

CV, desvio padrão relativo



Os resultados obtidos para a fração microssomal incubada com 200  $\mu\text{L}$  de HCQ apresentaram CV acima de 15%, para os enantiômeros (+)-(S)-DCQ e (+)-(S)-DHCQ e, por esse motivo, não foram descritos na tabela.

#### 4.3.1.4. Outros testes de otimização

Com a finalidade de avaliar a influência do anestésico empregado (éter etílico), um experimento de metabolismo empregando a fração microssomal de fígado de ratos anestesiados com tiopental i. p. foi efetuado. O experimento foi conduzido nas condições de incubação selecionadas acima. A dosagem de proteínas para as frações microssomais foi de 63,6  $\text{mg mL}^{-1}$  e 59,8  $\text{mg mL}^{-1}$  para os ratos anestesiados com éter e com tiopental, respectivamente.

A Tabela 18 apresenta as concentrações dos enantiômeros, de cada metabólito produzido, na incubação com as frações microssomais dos animais anestesiados com éter e com tiopental.

Tabela 18: Concentrações médias de cada enantiômero nas duas condições de anestesia.

	Éter etílico				Tiopental			
	DCQ		DHCQ		DCQ		DHCQ	
	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-
<b>Conc.</b> ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	417,13	158,74	800,00	217,02	112,91	104,16	214,81	97,87
<b>CV (%)</b>	10,2	13,1	13,1	13,9	12,6	3,6	4,9	6,2

CV, desvio padrão relativo

Optou-se pela utilização do éter etílico como anestésico, em função da maior concentração de metabólitos produzidos.

Foi investigado também o metabolismo *in vitro* em frações microsossomais de fígados de ratos pré-tratados com fenobarbital, um indutor das isoformas do CYP450 [MASIMIREMBWA & HASLER, 1994]. A investigação mostrou apenas um leve aumento na concentração dos metabólitos, na fração microsossomal dos animais pré-tratados com o fenobarbital (Tabela 19). A dosagem de proteínas em ambas frações microsossomais foi de 37,8 mg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 19: Concentrações médias de cada enantiômero no experimento que avalia o efeito do indutor de metabolismo.

	Com fenobarbital				Sem fenobarbital			
	DCQ		DHCQ		DCQ		DHCQ	
	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-
<b>Conc.</b> (ng mL <sup>-1</sup> )	504,78	218,00	852,34	333,33	382,41	205,37	683,95	286,11
<b>CV (%)</b>	6,8	11,6	8,4	13,2	1,8	7,33	12,6	9,4

CV, desvio padrão relativo

Apesar do aumento na concentração dos enantiômeros produzidos para a maioria dos metabólitos, optou-se por trabalhar sem o indutor, visto que a utilização deste implicaria em um maior tempo gasto com os experimentos.

Após estudo das condições de incubação, chegou-se à condição otimizada.

- **Espécie de animal:** ratos Wistar e camundongos Balb-C
- **Anestésico:** éter etílico
- **Tempo de incubação:** 180 minutos (3 horas)
- **Concentração da HCQ racêmica:** 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$
- **Volume da solução padrão de HCQ racêmica:** 10  $\mu\text{L}$
- **volume da fração microssomal:** 500  $\mu\text{L}$

#### **4.3.2. Incubação com fração mitocondrial de homogeneizado de fígado**

O objetivo deste experimento foi verificar se a metabolização da HCQ ocorre também na fração mitocondrial do fígado do animal. Para este experimento os ratos foram anestesiados com tiopental e a dosagem de proteínas na fração mitocondrial foi de 73,4  $\text{mg mL}^{-1}$ . No mesmo experimento de incubação, foram incubadas frações microssomais, com 77,2  $\text{mg mL}^{-1}$  de proteínas. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos.

Observa-se que houve apenas formação do metabólito DCQ, inclusive em quantidade menor que o mesmo metabólito, formado a partir da incubação com a fração microssomal. Outra observação a ser feita foi a inversão na estereosseletividade para o metabólito DCQ.

Tabela 20: Concentrações médias de cada enantiômero no experimento que compara o metabolismo em frações microsomal e mitocondrial.

	Incubação com fração				Incubação com fração			
	microsomal				mitocondrial			
	DCQ		DHCQ		DCQ		DHCQ	
	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-
<b>Conc.</b> (ng mL <sup>-1</sup> )	300,22	155,96	500,95	196,82	78,05	186,8	não formou	não formou
<b>CV (%)</b>	7,7	10,1	3,7	8,5	5,5	5,1	-	-

CV, desvio padrão relativo

#### 4.3.3. Aplicação dos métodos

Os métodos desenvolvidos por HPLC e CE foram aplicados em estudo de metabolismo da HCQ, a partir da incubação com fração microsomal de fígado de ratos e/ou camundongos.

Para o método desenvolvido por HPLC foram utilizadas frações microsomais de fígado de ratos e camundongos, ambas com concentração de proteínas de 39 mg mL<sup>-1</sup>. Além da incubação com HCQ racêmica (1000 µg mL<sup>-1</sup>), conduziu-se a incubação com os enantiômeros isolados do fármaco (420 µg mL<sup>-1</sup> de (-)-(R)-HCQ e 630 µg mL<sup>-1</sup> de (+)-(S)-HCQ, aproximadamente), os quais foram separados e coletados pelo método desenvolvido neste trabalho. A incubação com os enantiômeros puros foi efetuada para determinar se o metabólito foi formado a partir do (-)-(R)- ou do (+)-(S)- enantiômero da HCQ. Cromatogramas representativos da incubação são mostrados na Figura 24.

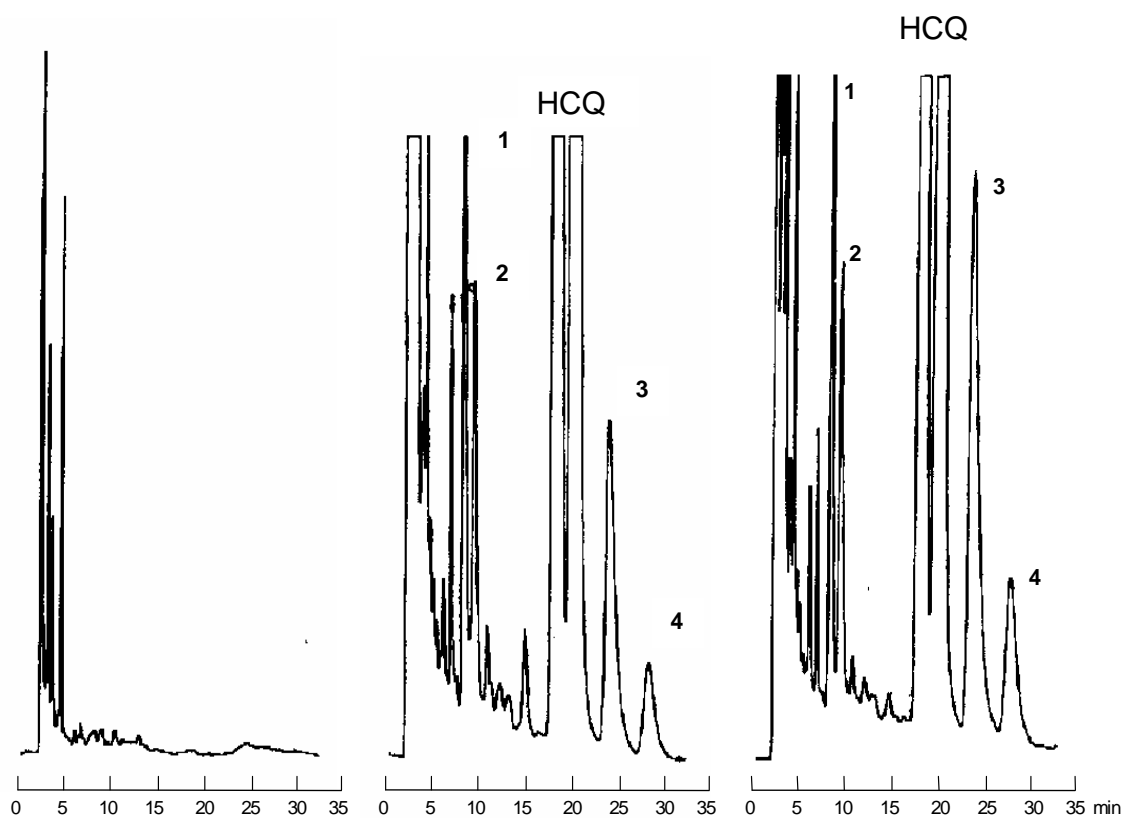


Figura 24: Cromatogramas de (A) branco da fração microsomal de fígado de rato, (B) incubação da fração microsomal de fígado de ratos com *rac*-HCQ e (C) incubação da fração microsomal de fígado de camundongos. (-)-(R)-DCQ (1) e (+)-(S)-DCQ (2), (-)-(R)-DHCQ (3) e (+)-(S)-DHCQ (4). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas na legenda da Figura 10.

As Tabelas 21 e 22 mostram as concentrações para os metabólitos da HCQ após incubação da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados, com fração microsomal de fígado de ratos e de camundongos, respectivamente.

Tabela 21: Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de ratos.

Incubação <i>rac</i> -HCQ	Metabólitos	DCQ		DHCQ	
		(-) – (R)-	(+) – (S)-	(-) – (R)-	(+) – (S)-
	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	273,43	124,67	667,35	200,56
	CV (%)	3,2	10,9	9,6	5,6
	Razão R/S	2,2		3,3	
<b>Incubação</b>					
<b>(-)-(R)-HCQ</b>	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	127,12		240,04	
	CV (%)	10,9		1,5	
<b>Incubação</b>					
<b>(+)-(S)-HCQ</b>	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )		61,08		84,96 <sup>a</sup>
	CV (%)		13,2		14,5

$n = 3$  para cada incubação; CV, desvio padrão relativo; <sup>a</sup>, resultado semiquantitativo, pois esse valor está abaixo do limite de quantificação do método.

Tabela 22: Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de camundongos.

Incubação <i>rac</i> -HCQ	Metabólitos	DCQ		DHCQ	
		(-) – (R)-	(+) – (S)-	(-) – (R)-	(+) – (S)-
	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	243,12	123,81	1164,45	341,69
	CV (%)	2,1	4,8	2,9	1,9
	Razão R/S	2,0		3,4	
<b>Incubação</b>					
<b>(-)-(R)-HCQ</b>	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )	170,20		742,25	
	CV (%)	7,6		9,2	
<b>Incubação</b>					
<b>(+)-(S)-HCQ</b>	Conc. (ng mL <sup>-1</sup> )		71,79		198,70
	CV (%)		7,2		4,3

$n = 3$  para cada incubação; CV, desvio padrão relativo

A razão da metabolização para o enantiômero (-)-(R)- foi maior e o (-)-(R)-DHCQ representou o principal metabólito. As razões de concentração [(-)-(R)/(+)-(S)] foram de 2,2 para o metabólito DCQ e 3,3 para o metabólito DHCQ em microsomas de fígado de ratos. Para microsomas de fígado de camundongos, as razões obtidas foram de 2,0 para o metabólito DCQ e 3,4 para o metabólito DHCQ.

Para a aplicação do método desenvolvido por CE, o estudo *in vitro* de metabolismo foi conduzido com frações microsomais de fígado de camundongos, com concentração de proteínas de 30,0 mg mL<sup>-1</sup> e incubação com HCQ racêmica (1000 µg mL<sup>-1</sup>). Um eletroferograma representativo da incubação é mostrado na Figura 25.

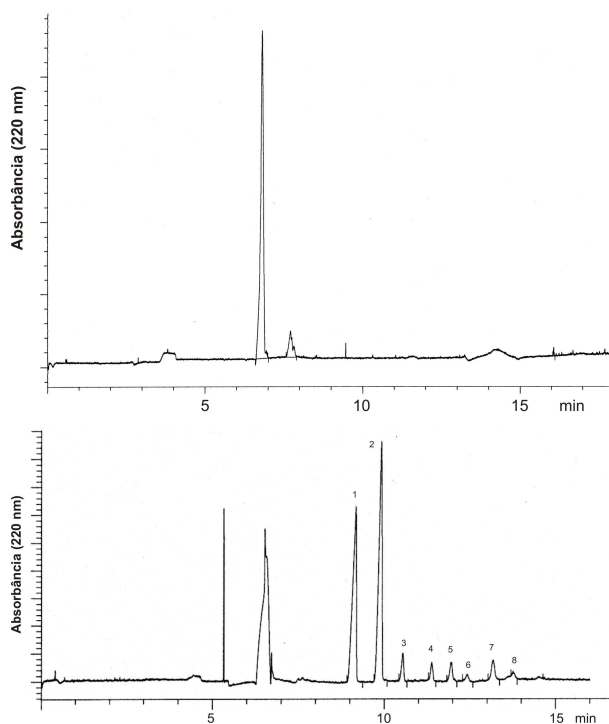


Figura 25: Eletroferogramas (A) de branco da fração microsomal e (B) da fração microsomal incubada com rac-HCQ: (1) (-)-(R)-HCQ, (2) (+)-(S)-HCQ, (3) (-)-(R)-DHCQ, (4) (+)-(S)-DHCQ, (5) (+)-(S)-DCQ, (6) (-)-(R)-BDCQ, (7) (-)-(R)-DCQ, (8) (+)-(S)-BDCQ

A Tabela 23 mostra a concentração para os metabólitos da HCQ após incubação da fração microsomal com HCQ racêmica.

Tabela 23: Resultados da incubação da HCQ com fração microsomal de fígado de camundongos.

Conc.	DHCQ		DCQ		BDCQ	
	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-
(ng mL <sup>-1</sup> )	275,3	199,9	227,8	184,1	129,3	108,5
CV (%)	7,6	8,9	10,1	12,9	10,5	11,0

*n* = 3, CV, desvio padrão relativo

O metabólito DHCQ representou o principal metabólito formado, na forma do enantiômero (-)-(R)-. Este estudo preliminar está em concordância com o estudo por HPLC, ou seja, (-)-(R)-HCQ é preferencialmente metabolizada por enzimas hepáticas de ratos e camundongos, resultando em maior concentração para todos os isômeros (-)-(R)- dos metabólitos. Entretanto, estudos farmacocinéticos *in vivo* têm mostrado  $(R)/(S) < 1$  para os metabólitos da HCQ em sangue ou soro sanguíneo de humanos ou ratos [WEY *et al*, 1995; DUCHARME *et al*, 1995; McLACHLAN *et al*, 1993; McLACHLAN *et al*, 1994; BROCKS *et al*, 1992 e 1994; EMAMI *et al*, 1998; MIDHA *et al*, 1996]. Assim, considerando os experimentos descritos neste trabalho, pode ser sugerido que outro processo enantiosseletivo, além do metabolismo, seria responsável pela farmacocinética enantiosseletiva da HCQ. Estas considerações têm sido também reportadas para a CQ e enfatizam a relevância de estudos *in vitro* de metabolismo para um completo entendimento da disposição cinética do fármaco.



---

## 5 - CONCLUSÕES

Neste trabalho foram relatados os resultados obtidos no desenvolvimento de métodos para análise enantiosseletiva da HCQ e de seus metabólitos, bem como a aplicação desses métodos em estudos *in vitro* de metabolismo do fármaco empregando frações microssomais de homogeneizados de fígado de ratos e de camundongos. As condições de incubação para o estudo de metabolismo foram otimizadas para posterior aplicação dos métodos desenvolvidos. No primeiro método (HPLC), a resolução dos enantiômeros dos metabólitos DCQ e DHCQ foi obtida, em uma etapa, empregando a coluna Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm) e hexano:isopropanol (92:8, v/v) acrescido de 0,1% de dietilamina como fase móvel. O procedimento de extração líquido-líquido utilizando clorofórmio como solvente extrator foi empregado para a preparação das amostras. No segundo método (CE), os enantiômeros da HCQ e de seus três metabólitos, DCQ, DHCQ e BDCQ, foram resolvidos em um tubo capilar de sílica fundida (50 cm x 50 µm), empregando solução do eletrólito tris(hidroximetil)aminometano 100 mmol L<sup>-1</sup>, ajustada a pH 9,0 com ácido fosfórico, acrescida de 1% (m/v) de S-β-CD e 30 mmol L<sup>-1</sup> de HP-β-CD. O procedimento de extração líquido-líquido utilizou tolueno como solvente extrator. As metodologias desenvolvidas são adequadas para a aplicação em estudos de metabolismo em frações microssomais de homogeneizados de fígado de animais, visto que os parâmetros de validação mostraram valores dentro dos limites exigidos na literatura. O estudo *in vitro* de metabolismo da HCQ mostrou que o enantiômero (-)-(R)-HCQ é preferencialmente metabolizado pelas enzimas hepáticas dos ratos e dos camundongos, resultando em maior concentração para todos os

---

isômeros (-)-(R)- dos metabólitos, sendo que o principal metabólito formado é o (-)-(R)-DHCQ, para ambas espécies estudadas.

---

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. P.; BONATO, P. S. Enantioselective hplc analysis of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 1001, p. S23-S166, 2001.

ALTRIA, K. D. *Capillary electrophoresis guidebook*. New Jersey, Humana Press, cap. 1, p. 3-15, 1996.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.*, v. 22 (7+8), p. 428-439, 2003.

BONATO, P. S. Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 4078-4094, 2003.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Quím. Nova*, v. 28(4), p. 683-691, 2005

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

BRESSOLLE, F.; AUDRAN, M.; PHAM, T-N; VALLON, J-J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *J. Chromatogr. B.*, v. 687, p. 303-336, 1996.

---

BROCKS, D. R.; PASSUTTO, F. M.; JAMALI, F. Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers. *J. Chromatogr.*, v.581, p. 83-92, 1992.

BROCKS, D. R.; SKEITH, K.J.; JOHNSTON, C.; EMAMI, J.; DAVIS, P.; RUSSELL, A. S.; JAMALI, F. Hematologic disposition of hydroxychloroquine enantiomers. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 34(11), p. 1088-1097, 1994.

BROCKS, D. R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 42(15), p. 1359-1382, 2003.

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

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. *J. Chromatogr. A*, v. 719, p. 3-13, 1996.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and Use of Mitochondria in Toxicological Research. In: *Biochemical Toxicology – a practical approach*. Oxford, IRL PRESS, cap. 9, p. 217-253, 1987.

CARMICHAEL, S. J.; CHARLES, B.; TETT, S. E. Population Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Ther. Drug. Monit.*, v. 25(6), p. 671-681, 2003.

CASS, Q. B.; DEGARI, A. L. G.; CASSIANO, N. The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol*, v. 23(7), p. 1029-1038, 2000.

---

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

CERVENKOVÁ, K.; BELEJOVA, M.; VESELÝ, J.; CHMELA, Z.; RYPKA, M.; ULRICHOVÁ, J.; MODRIANSKÝ, M.; MAUREL, P. Cell suspensions, cell cultures and tissue slices – Important metabolic in vitro systems. *Biomed. Papers*, v. 145(2), p. 57-60, 2001.

DUCHARME, J.; WAINER, I.W.; PARENTEAU, H.I.; RODMAN, J.H. Stereoselective distribution of hydroxychloroquine in the rabbit following single and multiple oral doses of the racemate and the separate enantiomers. *Chirality*, v. 6(4), p. 337-346, 1994.

DUCHARME, J.; FIEGER, H.; DUCHARME, M.P.; KHALIL, S.K.; WAINER, I.W. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after oral of the racemate to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 40(2), p. 127-133, 1995.

DUCHARME, J.; BAUNE, B.; TABURET, A. M.; FARINOTTI, R. Chloroquine metabolism in human liver microsomes. *Exp. Toxic. Pathol.*, v. 48(5), p. 345, 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*, v. 698, p. 243-250, 1997.

EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; McROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 44, p. 313-324, 2000.

---

EMAMI, J.; PASUTTO, F. M.; JAMALI, F. Effect of experimental Diabets Mellitus and Arthritis on the pharmacokinetics of hydroxychloroquine enantiomers in rats. *Pharm. Res.*, v. 15(6), p. 897-903, 1998.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Bioanalytical Method Validation. 2001. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em 10 de dezembro de 2005.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development. Process: studies in vitro. 1997. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>>. Acesso em 10 de maio de 2002.

FIEGER, H.; IREDALE, J.; WAINER, I.W. Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of a reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio. *Chirality*, v. 5(2), p. 65-70, 1993.

FRANCOTTE, E. R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. *J. Chromatogr. A*, v. 906, p. 379-397, 2001.

FRIED, K.; WAINER, I.W. Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when. *J. Chromatogr. B*, v. 689, p. 91-104, 1997.

HADLEY, M. R.; CAMILLERI, P.; HUTT, A. J. Enantiospecific analysis by capillary electrophoresis: applications in drug metabolism and pharmacokinetics. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1953-1976, 2000.

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

---

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9. ed., Rio de Janeiro, McGraw Hill, p.472, 1996.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; MCDOWALL, R. D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.17, p. 93-218, 1998.

HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. França, Hewlett-Packard Company, cap. 2, p. 11-38, 1992.

HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. França, Hewlett-Packard Company, cap. 4, p. 77-108, 1992.

HILHORST, M. J.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. Capillary electrokinetic separation techniques for profiling of drugs and related products. *Electrophoresis*, v. 22, p. 2542-2564, 2001.

IN VITRO TECHNOLOGIES. Introductions for Using Microsomes and S9 Fractions. 2001. Disponível em <<http://www.invitrotech.com>>. Acesso em 10 de maio de 2002.

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

IREDALE, J.; FIEGER, H.; WAINER, I.W. Determination of the stereoisomers of hydroxychloroquine and its metabolites in plasma and urine following a single oral administration of racemic hydroxychloroquine. *Semin. Arthritis Rheum.*, v. 23(2-1), p. 74-81, 1993.

---

ISSAQ, H. J. Thirty-five years of capillary electrophoresis: advances and perspectives. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, v. 25(8), p. 1153-1170, 2002.

JERDI, M. C.; DAALI, Y.; OESTREICHER, M. K.; CHERKAOUI, S.; DAYER, P. A. Simplified analytical method for a phenotyping cocktail of major CYP450 biotransformation routes. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 35, p. 1203-1212, 2004.

JONES, R. S. Liver Perfusion Techniques in Toxicology. In: *Biochemical Toxicology – a practical approach*. Oxford, IRL PRESS, cap. 2, p. 23-55, 1987.

KELLY, M. A.; CLARK, B. J.; ALTRIA, K. D. Investigation into the effects of sample dissolving solvents and sample matrices on the separation obtained in capillary electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.*, v. 21, p. 193-196, 1998.

KREMERS, P.; BEAUNE, P.; CRESTEIL, T.; DE GRAEVE, J.; COLUMELLI, S.; LEROUX, J. P.; GIELEN, J. E. Cytocrome P450 Monooxygenase Activities in Human and Rat Liver Microsomes. *Eur. J. Biochem.*, v. 118, p. 599-606, 1981.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Medic. Res. Rev.*, v. 20(5), p. 397-411, 2001.

LAKE, B. G. Preparation and Characterization of Microsomal Fractions for Studies on Xenobiotic Metabolism. In: *Biochemical Toxicology – a practical approach*. Oxford, IRL PRESS, cap. 8, p. 183-215, 1987.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. *Quím. Nova*, v. 24(5), p. 683-688, 2001.

MACKA, M.; ANDERSSON, P.; HADDAD, P. R. Changes in electrolyte pH due to electrolysis during capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, v. 70, p. 743-749, 1998.



---

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

MARZO, A.; BALANT, L. P. Investigation of xenobiotic metabolism by CYP2D6 and CYP2C19: importance of enantioselective analytical methods. *J. Chromatogr. B*, v. 678, p. 73-92, 1996.

MASIMIREMBWA, C. M.; HASLER, J. A. Characterization of praziquantel metabolism by rat liver microsomes using cytochrome P450 inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, v. 48(9), p. 1779-1783, 1994.

MASIMIREMBWA, C. M.; HASLER, J. A.; JOHANSSON, I. Inhibitory effects of antiparasitic drugs on cytochrome P450 2D6. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 48, p. 35-38, 1995.

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

McLACHLAN, A.; TETT, S. E.; CUTLER, D. J. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in biological fluids using an  $\alpha_1$ -acid glycoprotein stationary phase. *J. Chromatogr.*, v. 570, p. 119-127, 1991.

McLACHLAN, A.J.; TETT, S.E.; CUTLER, D.J.; DAY, R.O. Disposition of the enantiomers of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis following multiple doses of the racemate. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 36(1), p. 78-81, 1993.

---

McLACHLAN, A.J.; TETT, S.E.; CUTLER, D.J.; DAY, R.O. Disposition and absorption of hydroxychloroquine enantiomers following a single dose of the racemate. *Chirality*, v. 6(4), p. 360-364, 1994.

MIDHA, K. K.; HUBBARD, J. W.; RAWSON, M. J.; McKAY, G.; SCHWEDE, R. The roles of stereochemistry and partial areas in a parallel design study to assess the bioequivalence of two formulations of hydroxychloroquine: a drug with a very long half life. *Eur. J. Pharmac. Sci.*, v. 4, p. 283-292, 1996.

MILLOT, M. C. Separations of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J. Chromatog B*, v. 797, p. 131-159, 2003.

MÜLLER, D.; BLASCHKE, G. Enantioselective assay of chloroquine and its main metabolite deethylchloroquine in human plasma by capillary electrophoresis. *J. Chromatog. Sci.*, v.38, p. 435-440, 2000.

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

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, K. 4-Aminoquinolines – Past, Present and Future: A Chemical Perspective. *Pharmacol. Ther.*, v. 77(1), p. 29-58, 1998.

PETRI, M. Hydroxychloroquine: past, present, future. *Lupus*, v.7, p. 65-67, 1998.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. *Introducción a la HPLC – aplicación y práctica*, Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, cap. 12, p. 301-328, 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*, v. 24(1), p. 68-76, 2001.

ROGAN, M. M.; ALTRIA, K. D. *Introduction to the theory and applications of chiral capillary electrophoresis*. New Jersey, Beckman Instruments, 38p, 1995.

SAÚDE PÚBLICA. Utilização de modelos *in vitro* para o estudo da biotransformação de xenobióticos, 2001. Disponível em <[http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9798/g003/g003\\_2.htm](http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9798/g003/g003_2.htm)>. Acesso em 03 de abril de 2003.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Sci.*, v.8(3), p. 309-312, 1992.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Chiral Separation. In: *Practical HPLC method development*. 2. ed., New York, cap. 12, p. 537, 1997.

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

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Quím. Nova*, v. 19(2), p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Quím. Nova*, v. 20(5), p. 493-511, 1997.

---

VERLEYSSEN, K.; SANDRA, P. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v.19, p. 2798-2833, 1998.

VON BAHR, C.; GROTH, C. G.; JANSSON, H.; LUNDGREN, G.; LIND, M.; GLAUMANN, D. H. Drug metabolism in human liver in vitro: Establishment of a human liver bank. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.27(6), p. 711-725, 1980.

WAINER, I. W.; CHEN, J.C.; PARENTEAU, H.; ABDULLAH, S.; DUCHARME, J.; FIEGER, H.; IREDALE, J. Distribution of the enantiomers of hydroxychloroquine and its metabolites in ocular tissues of the rabbit after oral administration of racemic-hydroxychloroquine. *Chirality*, v. 6(4), p. 347-354, 1994.

WAINER, I.W.; DUCHARME, J.; GRANVIL, C. P.; PARENTEAU, H.; ABDULLAH, S. Using chirality as a unique probe of pharmacological properties. *J. Chromatog. A*, v. 694, p. 169-179, 1995.

WEI, Y.; NIGARD, G. A.; KHALIL, S. K. W. A hplc method for the separation and quantification of the enantiomers of hydroxychloroquine and its three major metabolites. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 17(16), p. 3479-3490, 1994.

WEY, Y.; NYGARD, G.A.; ELLERTSON, S.L.; KHALIL, S.K. Stereoselective disposition of hydroxychloroquine and its metabolites in rats. *Chirality*, v. 7(8), p. 598-604, 1995.

WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Antimalarials: Unapproved Uses or Indications. *Clin. Dermatol.*, v. 18, p. 17-35, 2000.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral Discrimination on Polysaccharides Derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

---

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A*, v. 906, p. 105-125, 2001.

ZAUGG, S.; THORMANN, W. Enantioselective determination of basic drugs in body fluids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, v. 875, p. 27-41, 2000.