

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Quantificação dos Metabólitos do Albendazol em Plasma Bovino  
por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência, com Injeção  
Direta de Amostras”**

**Kátia Roberta Anacleto Belaz\***

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química, como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Química, área de  
concentração Química Orgânica

**Orientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira**

**\* Bolsista CNPq**

São Carlos - SP  
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B426qm

Belaz, Kátia Roberta Anacleto.

Quantificação dos metabólitos do albendazol em plasma bovino por cromatografia líquida quiral de alta eficiência, com injeção direta de amostras / Kátia Roberta Anacleto Belaz. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

148 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia quiral. 3. Colunas RAM. 4. Benzimidazóis. 5. Plasma bovino. I. Título.

CDD: 543.089 (20ª)

*“... a potência que faz com que todos tenham o desejo de aprender e pesquisar é a curiosidade. Sem ela, ninguém quer aprender. Quem está possuído pela curiosidade não descansa, nem desanima. Não é necessário que se lhe imponham obrigações e deveres porque o prazer e a satisfação em fazer ciência é motivação mais forte.”*

Dimenstein

*Dedico esta dissertação...*

*... aos meus maravilhosos pais, Juraci e José, pelo apoio e amor a mim demonstrado durante toda a minha vida.*

*... aos meus irmãos Rodrigo e Bruna, pelo amor e amizade, mas além disso por cuidarem de nossos pais na minha ausência.*

*... a Rosana, Hermínia, Felipe, Fernanda e  
Júnior pela amizade, apoio e incentivo recebido.*

*... ao querido Valdemir, pela paciência,  
compreensão e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina V. Oliveira**, pela orientação, aprendizado e amizade.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Quezia Bezerra Cass**, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas de seu laboratório ainda no meu primeiro ano de graduação.

Ao **Prof<sup>o</sup>. Dr. Nerilso** por não ter me deixado desistir da Química.

A **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar

A **todos os professores** do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE: **Aline, Angela, Airton, Bia, Bibi, Carmen, Cecília, Fernando (Bomba), Fernando (24), Flávio, Juliana, Kenia, Lúcia, Marcela, Mariana, Malu, Marina, Mirian, Neila, Patrícia, Regina, Ricardo, Tiago, Túlio, Vanessa e Virgínia**. Agradeço todos pela amizade, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.

A todos os amigos dos Laboratórios Vizinhos.

Ao **Alexandre Augusto Cruz**, por sua infinita disponibilidade de ajudar com os equipamentos e pela amizade.

À **Alessandra** pela amizade e alegria, que em tão pouco tempo contagiou a todos no laboratório.

À **Angela**, por sua disposição em sempre ajudar no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, paciência e simpatia que contagiava a todos.

Ao **CNPq**, pela bolsa fornecida.

A todos que puderam contribuir para que este trabalho fosse realizado.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha$	Fator de Separação
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{exc}$	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão
ABZ	Albendazol
ABZ-SO	Albendazol-Sulfóxido
ABZ-SO <sub>2</sub>	Albendazol-Sulfona
ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Albendazol-2-Amino-Sulfona
ACN	Acetonitrila
ADS	Alquil-Diol-Sílica ( <i>Alkyl-Diol-Silica</i> )
BSA	Albumina Sérica Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C <sub>18</sub>	Octadecil-Sílica
C <sub>8</sub>	Octil-Sílica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variação
C <sub>18</sub> -BSA	Fase RAM tipo octadecil-sílica BSA-Imobilizada
C <sub>8</sub> -BSA	Fase RAM tipo octil-sílica BSA-Imobilizada
CBB	Corante <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
d	Dubleto
dd	Duplo Dupleto
d.i.	Diâmetro Interno
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
dt	Duplo Tripleto
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FEQ	Fase Estacionária Quiral
HSA	Albumina Sérica Humana ( <i>Human Serum Albumin</i> )
ISRP	Fase de Superfície Interna Reversa ( <i>Internal Surface Reversed-Phase</i> )
ISO	Isopropanol
LPS	Fases com Grandes Partículas ( <i>Large Particules Support</i> )
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MFP	Fase de Função Mista ( <i>Mixed-Function Phase</i> )
PP	Precipitação de Proteínas
pI	Ponto Isoelétrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
r	Coefficiente de Correlação
RAM	Fases de Acesso Restrito ( <i>Restricted-Access Media</i> )
RAM-BSA	Fase RAM BSA-Imobilizada
Rs	Resolução
s	Singleto
sext	sextupletto
SHP	Fase Hidrofóbica Blindada ( <i>Shielded Hydrophobic Phase</i> )
SPS	Fase Semipermeável ( <i>Semi-Permeable Surface</i> )
t	Tripleto
UV	Ultravioleta



## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

FIGURA 1.1: Ciclo evolutivo da <i>Taenia solium</i> <sup>4</sup> .....	3
FIGURA 1.2: Incidência dos principais parasitas gastrintestinais em bezerros nas propriedades leiteiras. <sup>6</sup> .....	4
FIGURA 1.3: Principais classes de anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária	10
FIGURA 1.4: Metabolismo do albendazol .....	12
FIGURA 1.5: Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição. <sup>34</sup> .....	18
FIGURA 1.6: Representação das possíveis interações do carbamato com compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose. ....	23
FIGURA 1.7: Mecanismo cromatográfico das fases RAM; FH: Fase Hidrofóbica <sup>63</sup> ....	31

### Resultados e Discussões

FIGURA 4.1: aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI) .....	65
FIGURA 4.2: Esquema de síntese do (1): ABZ-SO e do (2): ABZ-SO <sub>2</sub> .....	66
FIGURA 4.3: Espectro de absorção no infravermelho para o albendazol-sulfóxido. ..	69
FIGURA 4.4: Espectro de absorção no do infravermelho para o albendazol-sulfona ..	69
FIGURA 4.5: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o albendazol-sulfóxido .....	71
FIGURA 4.6: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o albendazol-sulfóxido .....	71
FIGURA 4.7: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C para o albendazol-sulfóxido.....	72
FIGURA 4.8: Atribuições dos sinais de RMN- <sup>13</sup> C para o albendazol-sulfóxido .....	72
FIGURA 4.9: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o albendazol-sulfona .....	73
FIGURA 4.10: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o albendazol-sulfona. ....	74
FIGURA 4.11: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C para o albendazol-sulfona .....	74
FIGURA 4.12: Atribuições dos sinais de RMN- <sup>13</sup> C para o albendazol-sulfona. ....	75
FIGURA 4.13: Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina .....	78
FIGURA 4.14: Etapas de preparação das colunas RAM-BSA. <sup>63</sup> .....	79
FIGURA 4.15: Seqüência de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de Schiff entre BSA e glutaraldeído; (2a) e (2b) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais. <sup>63</sup> .....	80
FIGURA 4.16: Estrutura do Corante <i>Coomassie Brilliant Blue</i> (CBB). ....	81
FIGURA 4.17: Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do plasma bovino pelas colunas RAM-BSA. <sup>63</sup> .....	83
FIGURA 4.18: Espectros obtidos da reação do corante CBB com proteínas do plasma bovino, eluídas da coluna extratora C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10 µm). Espectros do Corante CBB com água e CBB complexado com proteínas de 50 µL; 100 µL e 200 µL de plasma bovino. ....	83

- FIGURA 4.19:** Espectros obtidos da amostra referência e da fração coletada da coluna extratora C<sub>8</sub>-BSA (5 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10 µm). Espectros do Corante CBB com água; CBB complexado com proteínas de 200 µL da solução referência e CBB complexado com proteínas de 200 µL da 1º fração eluída da coluna (0-2 min). **84**
- FIGURA 4.20:** Comparação entre os espectros do corante-proteína da segunda fração de plasma eluído pela coluna extratora C<sub>8</sub>-BSA (100 Å, 10 µm) (2-4 min) e do corante CBB com água. Volume de injeção: 200 µL ..... **85**
- FIGURA 4.21:** Percentagens de proteínas do plasma bovino excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída de (0-2 min). ..... **85**
- FIGURA 4.22:** Cromatogramas dos perfis de eluição do plasma bovino nas colunas RAM-BSA. Fase Móvel: água; vazão: 1,0 mL/min; λ=280 nm; volume de injeção: 200 µL. **87**
- FIGURA 4.23:** Celulose e amilose ..... **88**
- FIGURA 4.24:** Esquema do método para a preparação das colunas quirais<sup>38</sup> ..... **90**
- FIGURA 4.25:** Esquema da síntese do tris(arilcarbamato) de amilose. .... **91**
- FIGURA 4.26:** Esquema da reação de isocianato com água. .... **91**
- FIGURA 4.27:** Carbamatos preparados para a cobertura na sílica. .... **92**
- FIGURA 4.28:** Espectro no infravermelho da amilose não derivada. .... **93**
- FIGURA 4.29:** Espectro no infravermelho do FEQ-1 sintetizada. .... **93**
- FIGURA 4.30:** Padrões Cromatográficos usados na avaliação das colunas quirais utilizadas neste trabalho. (a) (±) - Base de Tröger; (b) (±) - Óxido de Trans-Estilbeno e (c) (±)-1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol. .... **95**
- FIGURA 4.31:** Cromatogramas do albendazol-sulfóxido. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50), Vazão: 0,5 mL/min e λ: 290 nm, em (a) Coluna tris(3,5-dimetóxilfenilcarbamato) de amilose e (b) Coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. .... **98**
- FIGURA 4.32:** Cromatograma dos analitos (1): ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; (2): R-(+)-ABZ-SO; (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ-SO<sub>2</sub>. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50) e λ: 290 nm, coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.) em APS-Nucleosil (500Å, 7µm), em (a) vazão de 0,5 mL/min e (b) vazão de 1,0 mL/min. .... **99**
- FIGURA 4.33:** Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos compostos em plasma bovino. .... **102**
- FIGURA 4.34:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10 µg/mL do (±)-ABZ-SO, 5 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>, 5 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.). Condições cromatográficas: Fases móveis (A): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (98:02); (B): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (80:20) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm. .... **103**
- FIGURA 4.35:** Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1: colunas não acopladas; Posição 2: Colunas acopladas. .... **104**
- FIGURA 4.36:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10 µg/mL do (±)-ABZ-SO, 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>, 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- (0,01 M; pH 7,5):EtOH (98:02); (B) Tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):EtOH (80:20) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M pH 7,5):EtOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/mim; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. (I): Interferente; (1): ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , (2): R-(+)- ABZ-SO, (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ- $\text{SO}_2$ . ..... 105
- FIGURA 4.37:** Cromatograma dos analitos (1): ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ ; (2): R-(+)-ABZ-SO; (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ- $\text{SO}_2$ . Coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.) em APS-Nucleosil (500 $\text{\AA}$ , 7 $\mu\text{m}$ ),  $\lambda$ : 290 nm, vazão de 0,5 mL/min. Fase Móvel: (a) Água/EtOH (50:50) e (b) Água/ACN (60:40)...... 106
- FIGURA 4.38:** Cromatograma obtido do plasma bovino fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , com acoplamento das colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm..... 108
- FIGURA 4.39:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , com acoplamento das colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. .... 111
- FIGURA 4.40:** Curvas analíticas para o ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ- $\text{SO}_2$  ..... 112
- FIGURA 4.41:** Cromatogramas comparativos entre duas colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) preparadas separadamente. Condições cromatográficas: Fases móveis (A): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10), vazão de 1,0 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm..... 118
- FIGURA 4.42:** Cromatogramas comparativos entre duas colunas analíticas preapraradas. Plasma fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , com acoplamento das colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. .... 118
- FIGURA 4.43:** Cromatogramas dos testes de estabilidade para os ciclos de degelo, com acoplamento das colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. .... 121

- FIGURA 4.44:** Cromatogramas teste de estabilidade de longa duração, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): Água/ACN/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm. .... **123**
- FIGURA 4.45:** Separação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido em escala analítica. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15,0 x 0,46 cm d.i.). Fase móvel: hexano/etanol (80:20); Vazão: 0,5 mL/min; V.injeção: 20 µL e λ: 290 nm. .... **131**
- FIGURA 4.46:** Cromatograma da separação em escala semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido. Coluna semipreparativa: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20,0 x 0,7 cm). Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v). Vazão: 3,0 mL/min; V.injeção: 500 µL e λ:290nm..... **132**
- FIGURA 4.47** Cromatograma para determinação da pureza do albendazol-sulfóxido. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm). Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v). Vazão: 3,0 mL/min; V.injeção: 20 µL e λ:290nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-ABZ-SO (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-ABZ-SO ..... **132**

## LISTA DE TABELAS

### Introdução

TABELA 1.1: Principais parasitas encontrados nos bovinos <sup>5</sup> .....	4
TABELA 1.2: Resultados médios do ganho de peso vivo em novilhas tratadas com anti-helmíntico e não tratadas <sup>5</sup> .....	8
TABELA 1.3: Resultado da produção leiteira por animal, de 835 fêmeas leiteiras tratadas com anti-helmíntico e 835 fêmeas leiteiras controle tratadas com placebo, durante 220 dias de estudo <sup>12</sup> .....	9
TABELA 1.4: Algumas das fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente. <sup>25</sup>	17
TABELA 1.5: Principais fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente. <sup>25</sup> .....	22
TABELA 1.6: Porcentagens de proteínas encontradas no plasma bovino. <sup>56</sup> .....	26
TABELA 1.7: Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Continua).....	36

### Resultados e Discussões

TABELA 4.1: Resultados da análise elementar para o albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona .....	67
TABELA 4.2: Intervalo de frequências de absorção para grupamentos sulfóxido e sulfona. <sup>97</sup> .....	68
TABELA 4.3: Principais bandas no infravermelho encontradas para os compostos sintetizados .....	68
TABELA 4.4: Percentagens de proteínas do plasma bovino excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída (0-2 min) e respectivos coeficientes de variação das injeções.....	86
TABELA 4.5: Principais bandas no infravermelho encontradas para os carbamatos sintetizados .....	94
TABELA 4.6: Resultados da análise elementar para as FEQs sintetizadas .....	94
TABELA 4.7: Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para albendazol-sulfóxido no modo reverso de eluição .....	97
TABELA 4.8: Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão protéica e eluição dos analitos nas colunas RAM-BSA C <sub>8</sub> e C <sub>18</sub> selecionadas para o estudo.....	102
TABELA 4.9: Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão protéica e eluição dos analitos na coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA.....	107
TABELA 4.10: Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão protéica e eluição dos analitos na coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise dos metabólitos do albendazol na coluna quiral FEQ-1 (15,0 x 0,46 cm d.i.). Temperatura de 30°C.....	109

<b>TABELA 4.11:</b> Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=5) em plasma bovino .....	<b>114</b>
<b>TABELA 4.12:</b> Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3). .....	<b>115</b>
<b>TABELA 4.13:</b> Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=5) .....	<b>116</b>
<b>TABELA 4.14:</b> ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3). .....	<b>117</b>
<b>TABELA 4.15:</b> Resultados do estudo de estabilidade a ciclos de degelo para o ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3). .....	<b>120</b>
<b>TABELA 4.16:</b> Resultados do estudo de estabilidade do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3), nas avaliações de estabilidade de curta duração. ....	<b>122</b>
<b>TABELA 4.17:</b> Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de plasma, fortificadas com ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> , armazenadas a -20°C. ....	<b>124</b>
<b>TABELA 4.18:</b> Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de plasma, fortificadas com ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> , armazenadas a -20°C. ....	<b>125</b>
<b>TABELA 4.19:</b> Tabela comparativa entre as colunas analíticas quirais. ....	<b>128</b>
<b>TABELA 4.20:</b> Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do albandazol-sulfóxido .....	<b>133</b>

## RESUMO

**"Quantificação dos Metabólitos do Albendazol em Plasma Bovino por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência, com Injeção Direta de Amostras".**

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e validação de um método, sensível e enantiosseletivo, por Cromatografia Líquida Multidimensional de Alta Eficiência, para a determinação dos metabólitos do albendazol: o albendazol-sulfóxido, metabólito quiral, albendazol-sulfona e albendazol-2-amino-sulfona, em plasma bovino. Os compostos ( $\pm$ )-albendazol-sulfóxido, albendazol-sulfona e 2-amino-sulfona foram extraídos do plasma bovino através do emprego de uma coluna extratora da fase hidrofóbica  $C_8$ , do tipo fase de acesso restrito de albumina sérica bovina ( $C_8$ -RAM-BSA) (5,0 x 0,46 cm d.i.) e analisados em uma coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (15,0 x 0,46 cm d.i.). A separação cromatográfica de todos os compostos de interesse foi obtida através do uso de uma fase móvel composta por tampão fosfato (0,01 M; pH 7,5):acetonitrila (60:40 v/v), com vazão de 0,5 mL/min e detecção por fluorescência,  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  de 290 e 320 nm, respectivamente. As curvas de calibração foram lineares nas faixas de 40,00-1280 ng/mL para cada enantiômero do albendazol-sulfóxido, de 10,00-320,0 ng/mL para o albendazol-sulfona e de 20,00-320,0 ng/mL para o albendazol-2-amino-sulfona. O método validado mostrou linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade adequada para ser utilizado em estudos farmacocinéticos após administração do albendazol por diferentes vias. Ainda neste trabalho, foi realizada a síntese de dois dos metabólitos do albendazol, o albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona, através da oxidação do sulfeto com emprego do complexo aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI).

## ABSTRACT

### "Quantification of Albendazole Metabolites in Bovine Plasma by High Performance Liquid Chromatography, using Direct Injection of Samples"

This work presents the development and validation of a sensitive and enantioselective multidimensional high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of albendazole metabolites: albendazole sulphoxide, chiral compound, albendazole sulphone and albendazole 2-aminesulphone in bovine plasma. The compounds, ( $\pm$ )-albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and 2-aminesulphone were extracted from bovine plasma using a octyl restricted access media bovine serum albumin column ( $C_8$ -RAM-BSA) (5.0 x 0.46 cm i.d.) and analyzed on a chiral column containing amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated onto APS-Nucleosil support, as stationary phase (15.0 x 0.46 cm i.d.). The chromatographic separations of all target compounds were achieved using a mobile phase composed of phosphate buffer (0.01 M; pH 7.5):acetonitrile (60:40 v/v), flow rate of 0.5 mL/min and fluorescence detection at 290 nm and 320 nm, excitation and emission, respectively. The calibration curves were linear in the concentration range of 40.00-1280 ng/ml for each albendazole sulphoxide enantiomer, 10.0-320 ng/mL for albendazole sulphone and 10.0-320 ng/mL for albendazole 2-aminesulphone. The validated method showed linearity, precision, accuracy and adequate sensitivity, allowing it to be appropriate for pharmacokinetics studies after administration of albendazole by different routes. Moreover, two metabolites of albendazole, the albendazole sulphoxide and albendazole sulphone, were synthesized by oxidation reaction using the aquo(N-oxo of piridine) molybdenum (VI) oxo diperoxo complexe.





<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>44</b>
3.1 - <i>Generalidades</i> .....	<b>44</b>
3.2 - <i>Reação de Oxidação do Albendazol</i> .....	<b>47</b>
3.3 - <i>Fases Estacionárias Quirais</i> .....	<b>49</b>
3.3.1 - <i>Síntese das fases estacionárias quirais de celulose e amilose</i> .....	<b>49</b>
3.3.2 - <i>Derivatização do suporte 3-aminopropilsílica</i> .....	<b>51</b>
3.3.3 - <i>Cobertura do carbamato ao suporte APS-Nucleosil</i> .....	<b>51</b>
3.3.4 - <i>Empacotamento das fases estacionárias</i> .....	<b>52</b>
3.3.4.1 - <i>Colunas Analíticas</i> .....	<b>52</b>
3.3.4.2 - <i>Coluna Semipreparativa</i> .....	<b>52</b>
3.4 - <i>Separação Enantiomérica do Albendazol-Sulfóxido em Escala Multi-Miligrama</i> .....	<b>53</b>
3.5 - <i>Preparo das Colunas RAM-BSA</i> .....	<b>53</b>
3.5.1 - <i>Sílicas Utilizadas</i> .....	<b>53</b>
3.5.2 - <i>Empacotamento das Colunas</i> .....	<b>53</b>
3.5.3 - <i>Imobilização das Fases Hidrofóbicas com BSA</i> .....	<b>54</b>
3.6 - <i>Avaliação da Exclusão das Proteínas do Plasma Bovino pelas Colunas</i> .....	<b>54</b>
3.6.1 - <i>Determinação de Proteínas Totais em Plasma Bovino - Método de Bradford</i> .....	<b>54</b>
3.6.1.1 - <i>Preparo do Reagente de Bradford</i> .....	<b>54</b>
3.6.1.2 - <i>Preparo das Amostras</i> .....	<b>54</b>
3.6.1.3 - <i>Medidas Espectrofotométricas das Amostras</i> .....	<b>55</b>
3.7 - <i>Desenvolvimento do Método Analítico</i> .....	<b>56</b>
3.7.1 - <i>Preparo das soluções padrão do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO</i> .....	<b>56</b>
3.7.2 - <i>Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade</i> .....	<b>57</b>
3.7.3 - <i>Obtenção das curvas analíticas</i> .....	<b>57</b>
3.8 - <i>Parâmetros Analíticos para a Validação de Fármacos em Matrizes Biológicas</i> .....	<b>59</b>
3.8.1 - <i>Seletividade</i> .....	<b>59</b>

3.8.2 - Recuperação .....	59
3.8.3 - Precisão e Exatidão .....	59
3.8.4 - Limite da quantificação (LQ) e detecção (LD) .....	60
3.8.4 - Testes de Estabilidade.....	60
3.8.4.1 - Estabilidades durante ciclos de degelo.....	61
3.8.4.2 - Estabilidade de longa duração.....	61
3.8.4.3 - Estabilidade de curta duração.....	61
3.8.4.4 - Estabilidades das amostras durante a permanência no auto-injetor.....	61
3.8.5.6 - Estabilidade da matriz biológica.....	62
3.8.5.7 - Estabilidade das amostras em solução.....	62
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>64</b>
4.1 - Síntese e Caracterização do Albendazol Sulfóxido e Sulfona....	64
4.2 - Colunas RAM-BSA.....	75
4.2.1 - Preparo das colunas RAM-BSA.....	78
4.2.2 - Exclusão das proteínas do plasma bovino pelas colunas RAM-BSA.....	81
4.3 -Fases Estacionárias Quirais de Polissacarídeos.....	88
4.3.1 - Síntese, caracterização e avaliação da fase tris (arilcarbamatos) de celulose e amilose.....	89
4.4 - Avaliação da Enantiorresolução do Albendazol-Sulfóxido nas FEQ-1, FEQ-2, FEQ-3 e FEQ-4, no modo reverso de eluição...	96
4.5 - Desenvolvimento do Método Analítico por CLAE Multidimensional.....	99
4.6 - Validação do Método.....	110
4.6.1 - Seletividade .....	110
4.6.2 - Linearidade.....	111
4.6.3 - Precisão e Exatidão .....	113
4.6.4 - Recuperação.....	115
4.6.5 - Limite da quantificação (LQ) e detecção (LD) .....	116
4.6.6 - Robustez.....	117
4.6.7 - Testes de Estabilidade.....	118

4.6.7.1 - Estabilidades durante ciclos de degelo.....	119
4.6.7.2 - Estabilidade de curta duração .....	119
4.6.7.3 - Estabilidade de longa duração.....	121
4.6.7.5 - Estabilidade das amostras em solução .....	123
4.6.7.6 - Estabilidade da matriz biológica.....	126
4.7 - Problemas Encontrados Durante a Validação do Método.....	126
4.8 - Separação Semipreparativa dos Enantiômeros do Albendazol- Sulfóxido.....	129
<b>5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>138</b>

# *INTRODUÇÃO*

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - INFECÇÕES PARASITÁRIAS: OCORRÊNCIA E PREJUÍZOS

Ainda hoje, as infecções parasitárias encontram-se disseminadas no mundo, apesar dos avanços no desenvolvimento de medicamentos antiparasitários polivalentes. Esta situação deve-se às precárias condições sanitárias, aos comportamentos e hábitos de higiene dos seres humanos e nível de educação e cultura de certas populações.<sup>1</sup> Entre as infecções parasitárias mais freqüentes destacam-se as helmintoses, que são causadas por diferentes classes de parasitas, entre elas: nematóides<sup>a</sup>, trematóides<sup>b</sup> e cestóides<sup>c</sup>, as quais podem acometer tanto humanos quanto bovinos, caprinos, suínos e ovinos.<sup>2</sup>

Os seres humanos constituem os hospedeiros definitivos de alguns helmintos, produzindo ovos ou larvas que são eliminados do corpo e infectam o hospedeiro intermediário.<sup>2,3</sup> Os hospedeiros intermediários habituais das duas tênias mais comuns, *Taenia saginata* e *Taenia solium*, são o gado bovino e suíno, respectivamente. Os seres humanos tornam-se infectados ao consumirem carne crua ou mal cozida, contendo larvas que se encistaram no tecido muscular animal, desta forma, fechando o ciclo evolutivo desses parasitas<sup>2,3</sup> (Figura 1.1).

---

<sup>a</sup>Nematóides: vermes cilíndricos afiliados nas extremidades

<sup>b</sup>Trematóides: vermes de corpo achatado e não segmentado

<sup>c</sup>Cestóides: vermes de corpo achatado e segmentado

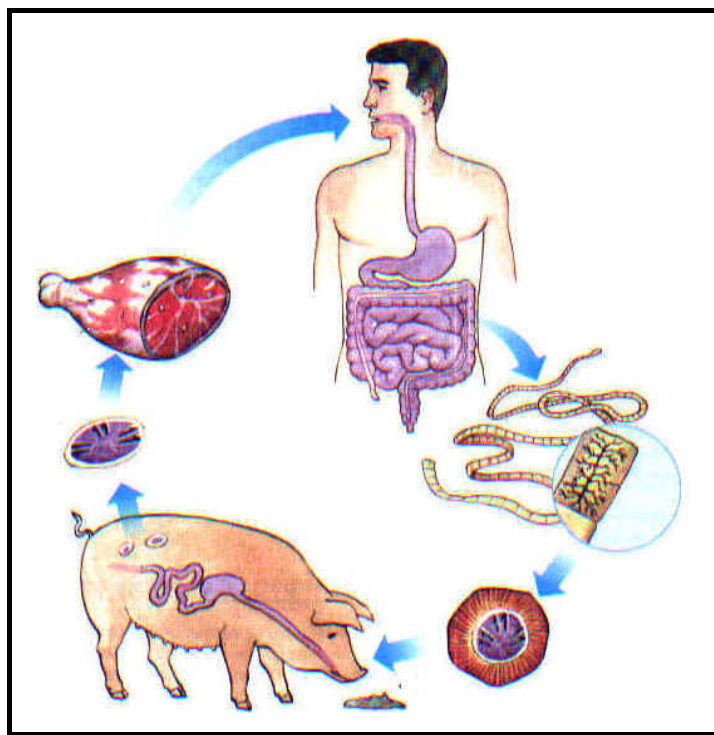


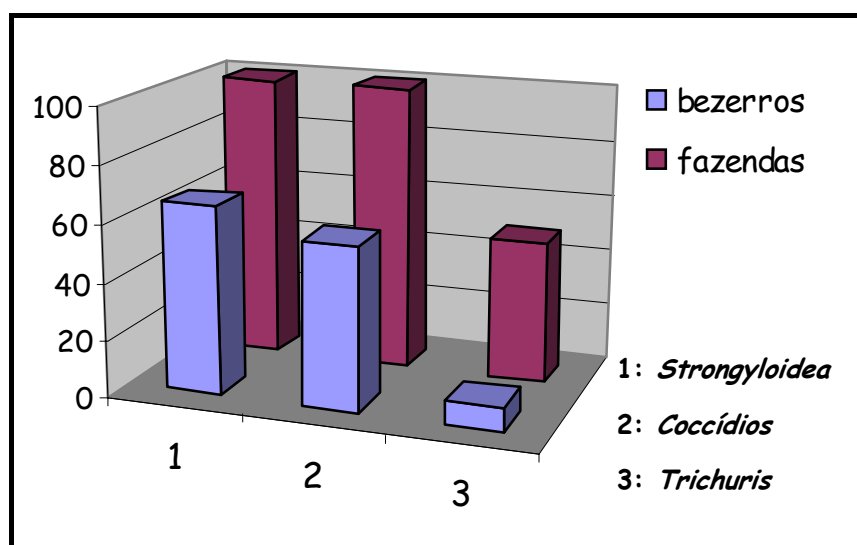
FIGURA 1.1: Ciclo evolutivo da *Taenia solium*<sup>4</sup>

Os bovinos podem servir de hospedeiros para várias espécies de parasitas, albergando-os nos diferentes compartimentos do aparelho digestivo e também no pulmão (Tabela 1.1).<sup>5</sup>

REPOSSI JUNIOR *et al.*<sup>6</sup> avaliaram em doze fazendas do município de Alegre-ES, a incidência de helmintos gastrintestinais em bovinos e, através do exame de fezes de bezerros de diferentes propriedades, constataram o diagnóstico de *Trichuris sp.* em 50% das propriedades estudadas, *Moniezia sp.* em 25%, *Strongyloides papillosus* em 33,3% e em todas (100%) foi constatada a presença de *Coccidios* e *Strongyloidea* (Figura 1.2).

TABELA 1.1: Principais parasitas encontrados nos bovinos<sup>5</sup>

Parasitas	Via de Infecção
<b>Abomaso</b>	
<i>Trichostrongylus axei</i>	Oral (larvas)
<i>Hamaemonchus sp.</i>	Oral (larvas)
<i>Ostertagia sp.</i>	Oral (larvas)
<b>Intestino Delgado</b>	
<i>T. colubriformis</i>	Oral (larvas)
<i>Strongyloides papillosus</i>	Oral (larvas) e Cutânea
<i>Toxocara vitulorum</i>	Oral (ovo)
<i>Cooperia sp.</i>	Oral (larvas)
<i>Nematodirus sp.</i>	Oral (larvas)
<i>Bunostomun sp.</i>	Oral (larvas) e Cutânea
<i>Moniezia sp.</i>	Oral (ácaros)
<b>Intestino Grosso</b>	
<i>Oesophagostomun sp.</i>	Oral (larvas)
<i>Trichuris sp.</i>	Oral (ovo)
<b>Pulmão</b>	
<i>Dicyocaulus viviparus</i>	Oral (larvas)

FIGURA 1.2: Incidência dos principais parasitas gastrintestinais em bezerros nas propriedades leiteiras.<sup>6</sup>



As infecções por vermes gastrintestinais apresentadas pelos bovinos geralmente são múltiplas, ou seja, causadas por mais de uma espécie de parasita. Nestes casos os danos ocasionados ao organismo do hospedeiro são resultados da somatória da ação das diferentes espécies de parasitas.

Os vermes são capazes de provocar, em maior ou menor grau, irritações ou inflamações da mucosa do trato gastrintestinal, com prejuízos na digestão e absorção de alimentos.<sup>5,6,7</sup> Desta forma, as infecções parasitárias dos animais são as maiores responsáveis pelas perdas na produtividade animal.

Como ocorrência comum das verminoses pode-se citar a redução do apetite do animal, que obviamente leva a conseqüências indesejáveis sobre o crescimento e ganho de peso do rebanho. Este acontecimento, no entanto, envolve vários fatores como: danos aos receptores que monitoram a tensão no interior do trato digestivo, diminuição da acidez do abomaso, alteração da motilidade e aumento de hormônios que favorecem a diminuição da ingestão de alimentos. Outro efeito negativo das verminoses é a sua interferência sobre o metabolismo protéico, responsável pela formação e manutenção da massa muscular. Este metabolismo é prejudicado pela diminuição da capacidade de digestão e retenção de nitrogênio e, ainda, pela perda de proteínas endógenas. As verminoses podem também comprometer o crescimento ósseo, pela perda de minerais como cálcio, fósforo e magnésio, através das fezes e urina.<sup>5,8</sup>

De maneira geral, considera-se que todos os bovinos criados em sistema extensivo de produção encontram-se parasitados, em maior ou menor grau, porém os danos causados pelos vermes nem sempre são visíveis.<sup>8</sup>

As verminoses se classificam em clínica e subclínica. No primeiro caso, os animais exibem sinais clínicos típicos de verminoses bastante conhecidos pelos técnicos e produtores, como: diarréia, mucosas pálidas (anemia), perda de apetite, pêlos secos e sem brilho, emagrecimento, debilidade das condições

físicas e até mesmo a morte. No entanto, a verminose clínica ocorre somente de 2 a 10% dos casos.<sup>5,7,8</sup>

As verminoses subclínicas estão presentes de 90 a 98% dos casos. Estas não apresentam sinais clínicos típicos de uma verminose, mas caracterizam-se por provocar retardo no crescimento do animal, diminuição do ganho de peso, diminuição da produção leiteira, retardo nas atividades reprodutivas e predisposição a outras doenças. A verminose subclínica pode impedir o ganho de peso do rebanho em até 45 kg/animal/ano, sem que o produtor se dê conta dos prejuízos provocados pelo mau desempenho dos animais.<sup>5,7,8</sup>

Portanto, o controle das verminoses constitui um desafio para produtores e veterinários. As medidas de controle a serem implementadas baseiam-se no conhecimento da complexidade que envolve os parasitas nas diferentes fases evolutivas, devendo-se levar em consideração a fase de vida livre na pastagem e a fase de vida parasitária no animal.<sup>5</sup>

Na fase de vida parasitária, a aplicação de vermífugos constitui a principal arma de combate aos vermes. Com isso, o impacto econômico das parasitoses sobre os rebanhos tem levado a indústria de medicamentos veterinários a exaustivas pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários. Avanços significativos neste setor têm colocado à disposição da pecuária bovina modernos endectocidas, que se caracterizam por atuar em parasitas internos e externos. Porém, na prática, nem sempre se consegue sucesso na aplicação destes fármacos, uma vez que os mesmos são, na maioria das vezes, utilizados de forma inadequada,<sup>5,8</sup> como a não pesagem dos animais para o cálculo da dose do medicamento e a não utilização do processo de compostagem das fezes.<sup>6</sup>

A grande problemática do uso incorreto destes medicamentos é a possibilidade de prejuízos futuros ocasionados pelo desenvolvimento da resistência dos parasitas aos medicamentos.<sup>6</sup>

Em trabalho realizado por MORENO *et al.*<sup>9</sup>, foi apresentado que a resistência dos parasitas aos anti-helmínticos é crucial em todo o mundo e até mesmo no Brasil, onde observou-se que 90% dos carneiros desenvolveram resistência ao albendazol, 84% ao levamisol, 73% à combinação albendazol-levamisol, 13% à ivermectina e 20% apresentaram resistência ao closantel.

Portanto, a administração dos antiparasitários nos animais deve ser realizada de maneira mais eficiente, onde a compreensão do comportamento cinético dos fármacos, assim como sua melhor via de administração podem ser peças importantes neste controle.

## 1.2 - ANTI-HELMÍNTICOS NA MEDICINA VETERINÁRIA

O termo anti-helmíntico aplica-se a substâncias que atuam localmente para expulsar os vermes do trato gastrintestinal ou sistemicamente, para erradicar espécies e formas de helmintos em desenvolvimento, que invadem órgãos ou tecidos.<sup>10</sup>

Os fármacos utilizados como anti-helmínticos são usados no controle de endoparasitas, como: nematóides, cestóides e trematóides, os quais estão localizados no animal parasitado.<sup>2,10</sup>

O anti-helmíntico ideal caracteriza-se por apresentar composição química estável; ação sobre estágios adultos e imaturos em desenvolvimento ou inibidos; ação sobre diversas classes de helmintos; eficácia contra cepas resistentes; não interferir na imunidade; ter fácil administração e dose única ou de curta duração; boa tolerância pelo hospedeiro com alta margem de segurança; boa compatibilidade com outros compostos, ausência de resíduos no leite e tecidos, além de favorável custo benefício.<sup>11</sup>

O anti-helmíntico pode atuar ao produzir paralisia no verme ou ao lesar sua cutícula, resultando em digestão parcial ou rejeição do verme por

mecanismos imunológicos, pode também atuar no metabolismo do verme, esgotando suas reservas energéticas.<sup>2</sup>

A administração racional de anti-helmínticos tem trazido benefícios à pecuária, tanto para gado de corte quanto para a pecuária leiteira.

Conforme dados do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado do Paraná, o ganho de peso vivo foi superior em 40 kg nas novilhas tratadas com anti-helmíntico, quando comparadas com aquelas não tratadas (Tabela 1.2).

**TABELA 1.2:** Resultados médios do ganho de peso vivo em novilhas tratadas com anti-helmíntico e não tratadas<sup>5</sup>

<b>Variáveis (kg)</b>	<b>Controle sem Tratamento</b>	<b>Tratado com Anti-Helmíntico</b>
<b>Peso Inicial</b>	175	175
<b>Ganho Médio</b>	0,379	0,435
<b>Ganho Total</b>	265	305

Da mesma forma, foi também verificado o aumento na quantidade produzida de leite, durante 220 dias de estudos, onde vacas tratadas com anti-helmíntico produziram 63 litros de leite a mais que os animais do grupo controle. A produção de proteínas e gorduras no leite também foi superior nos animais tratados, sendo de 2,8 kg em relação à produção do grupo controle (Tabela 1.3).

**TABELA 1.3:** Resultado da produção leiteira por animal, de 835 fêmeas leiteiras tratadas com anti-helmíntico e 835 fêmeas leiteiras controle tratadas com placebo, durante 220 dias de estudo<sup>12</sup>

<b>Variáveis</b>	<b>Controle sem Tratamento</b>	<b>Tratado com Anti-Helmíntico</b>
<b>Leite (L)</b>	4966	5029
<b>Gordura (kg)</b>	200,4	203,2
<b>Proteína (kg)</b>	164,3	167,1

Em trabalho realizado por BIACHIN *et al.*<sup>13</sup>, estimou-se que o desempenho financeiro dos animais dosificados com anti-helmínticos, três vezes ao ano, nos meses de maio, julho e setembro, foi melhor, apresentando um retorno calculado em 457,46% em dois anos. O benefício financeiro líquido alcançou o valor de 6.948.338 arrobas de carcaça de boi gordo, aproximadamente, 167 milhões de dólares.

Deste modo, diante da importância econômica que animais sadios de corte e produtores de leite representam, grande atenção tem sido dada às questões relacionadas à qualidade e ao bom desenvolvimento dos animais e o uso racional de anti-helmínticos na medicina veterinária tem sido adotada como prática rotineira pelos produtores.

As principais classes de anti-helmínticos usadas na pecuária pertencem às avermectinas, aos benzimidazóis, imidazotiazóis e salicilanilídeos, conforme Figura 1.3.<sup>14</sup> Dentre estes, os benzimidazóis são os mais amplamente utilizados na medicina veterinária, merecendo então o devido destaque.

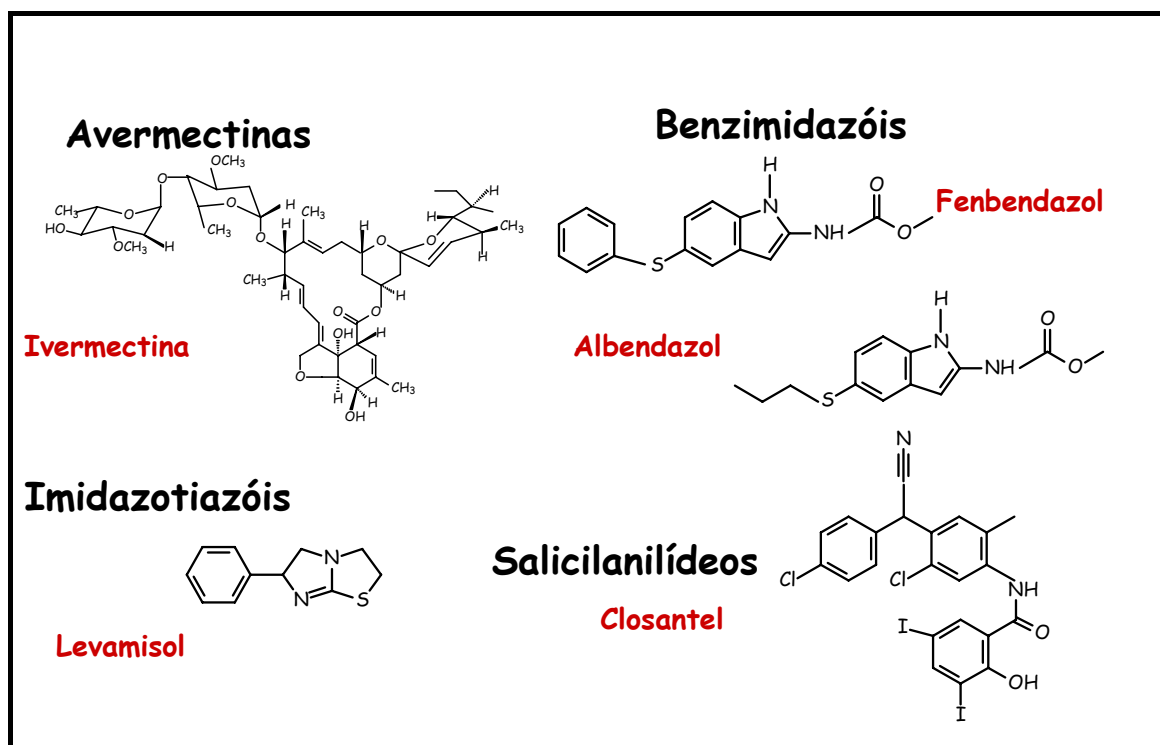


FIGURA 1.3: Principais classes de anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária

### 1.3 - ANTI-HELMÍNTICOS BENZIMIDAZÓLICOS

Desde a descoberta do tiabendazol em 1961, vários anti-helmínticos benzimidazólicos têm se tornado disponível para o tratamento de uma gama de helmintoses. O amplo espectro de atividade desses medicamentos, o baixo custo, a alta eficácia e a facilidade da sua administração tornaram os benzimidazóis amplamente utilizados no tratamento, em larga escala, de infecções parasitárias na medicina veterinária.<sup>1</sup>

Os benzimidazóis produzem, nos parasitas suscetíveis, alterações bioquímicas, incluindo a inibição da fumarato redutase mitocondrial, a redução do transporte de glicose e o desacoplamento da fosforilação oxidativa, mas provavelmente a sua principal ação é inibir a polimerização dos microtúbulos, unindo-se à  $\beta$ -tubulina.<sup>9</sup>

Dentre os anti-helmínticos benzimidazólicos rotineiramente administrados na medicina veterinária, destaca-se o albendazol, devido ao amplo espectro de atividade que este possui frente a diferentes classes e estágios dos parasitas, sendo, portanto, selecionado para a realização deste trabalho.

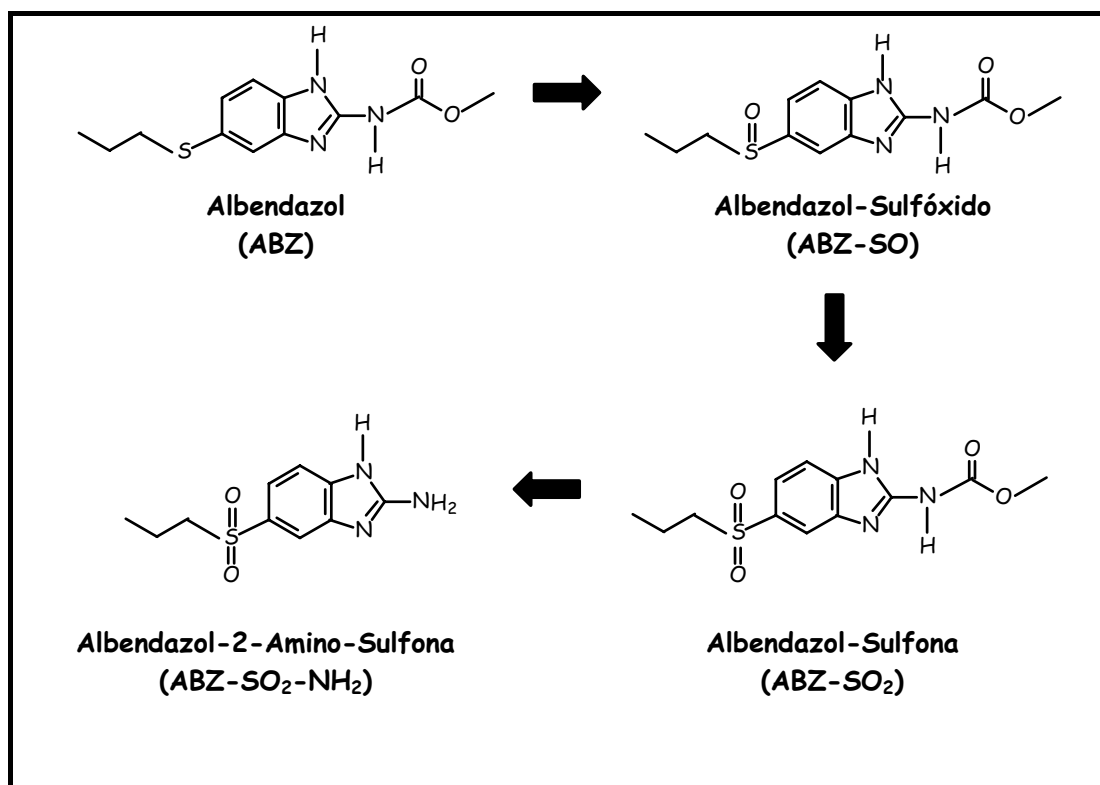
O albendazol (ABZ) é relativamente insolúvel em água e na maior parte dos solventes orgânicos, propriedade esta que influencia sua absorção e comportamento no organismo.<sup>15</sup>

A absorção oral de ABZ em camundongos e ratos é aproximadamente de 20-30% e em gado alcança valores de 50%, comparado com aproximadamente 1-5% em humanos.<sup>16</sup> A absorção em humanos é intensificada pela presença de alimentos gordurosos, podendo ser aumentada em até cinco vezes.<sup>10</sup>

O albendazol é um fármaco particularmente importante, pois este é um pró-fármaco que durante sua metabolização requer ativação no fígado pelo citocromo P450 (CYP450), tanto em animais como em humanos.<sup>16</sup> Essa metabolização, depois da administração oral, é bastante rápida, portanto não sendo o ABZ detectado em plasma de carneiros, de gado e de humanos.<sup>17</sup>

A farmacocinética do albendazol foi analisada em diferentes espécies animais, onde estudos envolvendo carneiros<sup>17</sup>, bezerras<sup>18</sup> e humanos<sup>19,20</sup> demonstraram que este é rapidamente e extensivamente metabolizado para a forma albendazol-sulfóxido (ABZ-SO), albendazol-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) e albendazol-2-amino-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) (Figura 1.4).

O albendazol-sulfóxido apresenta um centro assimétrico no átomo de enxofre, por isso apresenta-se na forma de dois enantiômeros, o R-(+)-ABZ-SO e o S-(-)-ABZSO.<sup>20</sup>



**FIGURA 1.4:** Metabolismo do albendazol

O albendazol-sulfóxido, metabólito ativo, é considerado diretamente ou indiretamente responsável pela eficácia e toxicidade do albendazol, sendo este oxidado e convertido em albendazol-sulfona. O grupo carbamato também é rapidamente removido por hidrólise, levando a formação do albendazol-2-amino-sulfona. Este último é o metabólito minoritário e, assim como o albendazol-sulfona, não apresenta atividade farmacológica.<sup>16,21</sup>

Em humanos, a metabolização do albendazol-sulfóxido, quiral, é enantiosseletiva, onde citocromos P450 são os responsáveis pela formação de S-(-)-albendazol-sulfóxido, enquanto que a formação do R-(+)-albendazol-sulfóxido é proveniente da metabolização via enzimas flavinas. A oxidação subsequente para formação de albendazol-sulfona é dependente de isoenzimas da CYP450.<sup>16</sup>

LANCHOTE *et al.*<sup>19</sup> desenvolveram um método para quantificação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona em plasma humano. Este estudo relata que o R-(+)-ABZ-SO é encontrado na corrente



sanguínea depois de 12 horas da administração oral do albendazol, na concentração de 30 ng/mL, enquanto que o S-(-)-ABZ-SO não é mais detectado neste mesmo período de tempo.

Um estudo semelhante foi realizado por GARCIA *et al.*<sup>22</sup>, utilizando-se plasma de camundongos. No entanto, a concentração em plasma do R-(+)-ABZ-SO foi cerca de 25 ng/mL, enquanto que o do S-(-) foi de 75 ng/mL, depois de 24 horas da administração oral do albendazol.

Portanto, o R-(+)-ABZ-SO é predominante em plasma humano, de carneiros, cachorros e cabras, enquanto que o S-(-)-ABZ-SO é predominante em ratos e camundongos.<sup>22</sup>

Tendo em vista que o albendazol é um pró-fármaco e apresenta baixa solubilidade em água (0,61 µg/mL), algumas empresas veterinárias têm comercializado a mistura racêmica do albendazol-sulfóxido, uma vez que este composto é mais solúvel (62 µg/mL) do que o ABZ, devido a presença do átomo de oxigênio.<sup>23</sup>

O trabalho realizado por CRISTOFOL *et al.*<sup>24</sup> relata que quando bezerros são tratados com (±)-ABZ-SO, o S-(-)-ABZ-SO é metabolizado significativamente mais rápido que o seu enantiômero, o R-(+)-ABZ-SO, sendo o (+)-enantiômero detectado em plasma de 2,5 minutos a 32 horas após a administração, enquanto que o (-)-enantiômero foi encontrado de 2,5 min a 16 horas.

Diante destas observações farmacológicas encontradas para os enantiômeros do albendazol-sulfóxido e uma vez que esses enantiômeros podem apresentar propriedades farmacológicas diferentes entre si quando administrados em bovinos, faz-se necessária a existência de métodos analíticos enantiosseletivos para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol, em fluidos biológicos. Análises desse tipo podem fornecer informações

importantes sobre o metabolismo e farmacocinética do fármaco, contribuindo para o controle parasitário em animais de maneira mais efetiva.

#### 1.4 - RESOLUÇÃO DE ENANTIÔMEROS

O desenvolvimento de técnicas analíticas seletivas, sensíveis e que possam discriminar isômeros ópticos é essencial para a investigação de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos quirais, bem como para a determinação da pureza enantiomérica em preparações farmacêuticas.<sup>25,26</sup> Desta forma, o desenvolvimento de métodos para obtenção de enantiômeros puros, seja por síntese assimétrica ou por resolução de misturas racêmicas, tem representado um grande desafio a Química Moderna, devido às propriedades termodinâmicas similares dos mesmos.<sup>27</sup>

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a separação de enantiômeros e apresenta-se como uma técnica útil e prática para análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos, onde se torna possível a determinação de purezas enantioméricas em preparações farmacêuticas<sup>25</sup> e também no controle de qualidade de medicamentos.<sup>28</sup>

A CLAE dispõe de dois métodos para a separação de enantiômeros, o método direto e o indireto.<sup>27,29</sup>

No procedimento indireto, o par de enantiômeros é submetido a uma reação de derivatização com um reagente quiral e enantiomericamente puro, visando obter diastereoisômeros, os quais apresentam propriedades físico-químicas diferentes e podem, então, ser separados empregando-se fases estacionárias aquirais.<sup>27,29,30</sup> Carbamatos, aminas e uréias são os produtos

diastereoisoméricos mais comuns das reações de misturas racêmicas com reagentes quirais puros.<sup>30</sup>

O método indireto apresenta como vantagens a disponibilidade comercial de reagentes para a derivatização de vários grupos funcionais e alta flexibilidade com respeito às condições cromatográficas.<sup>27,31</sup>

Embora esse procedimento tenha sido muito utilizado, hoje em dia seu emprego é menor, devido às desvantagens que o mesmo apresenta. Dentre estas se pode destacar: o maior consumo de tempo atribuído as reações de derivatização, necessidade de reagentes opticamente puros, a possibilidade de racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros, ou na sua estocagem, a necessidade de um tratamento químico posterior para a recuperação dos enantiômeros.<sup>29,30</sup>

No método direto a separação do par de enantiômeros é realizada através do uso de fases estacionárias quirais (FEQ) ou através da adição de aditivos à fase móvel.<sup>27</sup>

O uso de aditivos na fase móvel apresenta como vantagens a utilização de colunas convencionais e a possibilidade de utilização de diversos aditivos em uma mesma coluna. A desvantagem desse procedimento reside no custo elevado de se usar aditivos quirais na fase móvel, uma vez, que é consumido grande volume de solvente em cada análise.<sup>29,30</sup>

Já o uso de colunas com fases estacionárias quirais apresentam várias vantagens, dentre elas: não é necessária a derivatização preliminar da mistura racêmica, há uma grande variedade de colunas quirais disponíveis comercialmente, as análises cromatográficas são rápidas e os enantiômeros puros podem ser recuperados com relativa facilidade. Embora essas fases estacionárias apresentem um elevado custo e o mecanismo de separação quiral ainda não seja completamente elucidado para todas as fases quirais, este é o

método de separação de enantiômeros que tem conseguido maior destaque e aplicabilidade na separação de enantiômeros.<sup>29</sup>

## 1.5 - FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

Nas últimas décadas, inúmeros seletores quirais foram avaliados para verificar suas habilidades na resolução quiral, sendo estes empregados em centenas de novas fases estacionárias quirais.<sup>25</sup> Essas fases estão sendo empregadas nas mais diversas áreas, entre elas: farmacêutica, ambiental e de análises clínicas.<sup>32</sup>

A Tabela 1.4 relaciona algumas das fases estacionárias quirais mais utilizadas e disponíveis comercialmente.

A separação de enantiômeros através de fases estacionárias quirais está baseada na formação de um complexo diastereoisomérico transitório, entre os enantiômeros e o seletor quiral da fase estacionária.<sup>30</sup>

O modelo proposto de reconhecimento quiral está baseado na teoria de interação de três pontos,<sup>33</sup> ou seja, são necessários no mínimo três pontos de interação entre o enantiômero e o seletor quiral (Figura 1.5). Estas três interações devem ser simultâneas e devem ocorrer com três diferentes substituintes do centro estereogênico. Dependendo do número de interações existentes entre o seletor quiral e o enantiômero, há formação de dois complexos diastereoisoméricos intermediários com energia livre de Gibbs distintas. Esta diferença de energia determina o tempo de existência de cada complexo diastereoisomérico e a ordem de eluição de cada enantiômero, sendo aquele que forma o complexo menos estável, o qual elui primeiro.

As interações que podem ocorrer entre o seletor quiral e o enantiômero são forças intermoleculares como ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo, complexos de inclusão e impedimento estérico.<sup>30</sup>

**TABELA 1.4:** Algumas das fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente.<sup>25</sup>

SELETOR QUIRAL	NOME COMERCIAL	FABRICANTE
<b>SELETOR DE BAIXA MASSA MOLAR</b>		
D-dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 2	MACHEREY-NAGEL
L-dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 3	MACHEREY-NAGEL
(3R,4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(S,S)-Whelk-O1	REGIS TECHNOLOGIES
(3R,4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(R,R)-Whelk-O1	REGIS TECHNOLOGIES
<b>TROCA DE LIGANTE</b>		
N, N dioctil-L-alanina	CHIRALPAK MA (+)	DIACEL
L-hidroxiprolina - cobre	CHIRAL 1	MACHEREY-NAGEL
<b>ANTIBIÓTICOS MACROCÍCLICOS</b>		
Vancomicina	CHIROBIOTIC V	ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES
Teicoplamina	CHIROBIOTIC T	ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES
Ristocetina	CHIROBIOTIC R	ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES
<b>ÉTER DE COROA</b>		
(S) - 18 - coroa - 6 - éter	CROWNPAK CR (+)	DIACEL
(R) - 18 - coroa - 6 - éter	CROWNPAK CR (-)	DIACEL
<b>CICLODEXTRINAS</b>		
$\beta$ - ciclodextrina	NUCLEODEX $\beta$ -OH	MACHEREY-NAGEL
$\beta$ - ciclodextrina permetilada	NUCLEODEX $\beta$ -PM	MACHEREY-NAGEL
$\beta$ - ciclodextrina fenilcarbamato	ULTRON ES-PhCD	SHINWA CHEM.IND.
<b>PROTEÍNAS</b>		
Soroalbumina bovino	RESOLVOSIL BSA-7	MACHEREY-NAGEL
	ULTRON ES-BSA	SHINWA CHEM. IND.
	CHIRAL BSA	SHANDON
Soroalbumina humano	CHIRAL HSA	SHANDON
	CHIRAL - HSA	CHROMTECH AB
Ovomucóide	ULTRON ES-OVM	SHINWA CHEM. IND.
Avidina	BIOPTIC AV-1	GL SCIENCES
Celobioidrolase I	CHIRAL-CBH	CHROMTECH AB
Pepsina	ULTRON ES-PEPSIN	SHINWA CHEM. IND.

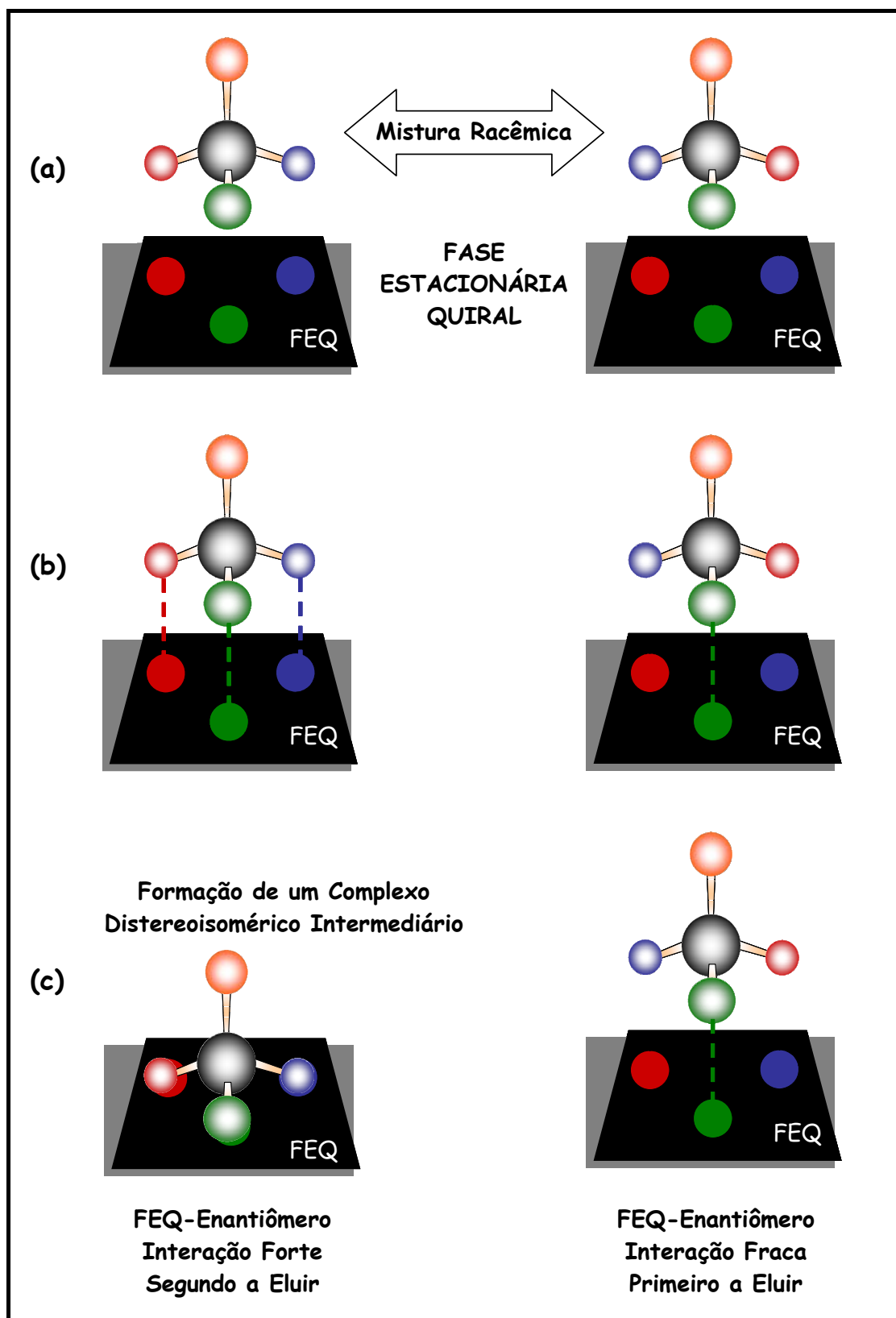


FIGURA 1.5: Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição.<sup>34</sup>

Devido ao grande número de fases quirais desenvolvidas, testadas e comercializadas, estas foram classificadas por Wainer<sup>35</sup>, de acordo com o mecanismo de reconhecimento quiral, dividindo-as em cinco tipos:

- **TIPO I:** O mecanismo de reconhecimento quiral está baseado na formação de um complexo diastereoisomérico entre o seletor quiral e as moléculas dos solutos, através de forças atrativas como ligação de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$  e dipolo-dipolo. Essas fases quirais são também denominadas de fases do tipo Pirkle.
- **TIPO II:** Este tipo de fase estacionária quiral também se vale de interações atrativas para separação, como as do tipo I, mas a formação de complexo de inclusão tem uma grande contribuição no mecanismo de reconhecimento quiral, como exemplo deste grupo, podemos citar as colunas quirais de polissacarídeos.
- **TIPO III:** O mecanismo de reconhecimento dessas fases é por formação de complexos de inclusão, onde há o encaixe do soluto na cavidade quiral da fase estacionária, o que resulta em complexos diastereoisoméricos de relativa estabilidade. Fazem parte desse grupo as fases quirais de ciclodextrinas, polímeros sintéticos e éteres de coroa.
- **TIPO IV:** Os aminoácidos, prolina, hidróxi-prolina, valina, ligados à sílica ou a um polímero, em conjunto com um eluente contendo normalmente íons cobre II, produzem um complexo metálico, o qual pode se ligar seletivamente a aminoácidos e a alguns compostos contendo grupos amina.
- **TIPO V:** Nessas fases a formação do complexo diastereoisomérico intermediário ocorre pela combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, de sítios de ligação muito específicos, com ligações de hidrogênio e de transferência de carga. Fazem parte desse grupo as fases quirais de proteínas.

Dentre as fases estacionárias quirais, merecido destaque é dado às fases de polissacarídeos, em função da grande versatilidade que essas apresentam e por demonstrarem excelente discriminação quiral para um extensa gama de compostos.<sup>36-39</sup>

### 1.5.1 - FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos de maior aplicabilidade como fases estacionárias quirais são a amilose e a celulose, os quais são polímeros que apresentam atividades ópticas e são encontrados abundantemente na natureza, mas *in natura* apresentam limitada capacidade de resolução quiral, propriedades mecânicas fracas, além de serem altamente polares.<sup>25,29,30</sup>

Entretanto, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como trisbenzoatos e trisfenilcarbamatos, criando novos sítios para reconhecimento quiral, melhorando assim as suas propriedades enantiosseletivas.<sup>36</sup>

O primeiro derivado de polissacarídeo largamente usado, desenvolvido por HESSE e HAGEL<sup>40</sup>, foi o triacetato de celulose (CTA-I), preparado por acetilação da celulose microcristalina em benzeno, que mostrou altas habilidades de reconhecimento quiral. Outro tipo de fase estacionária com habilidade de reconhecimento quiral completamente diferente foi desenvolvido por OKAMOTO *et al.*<sup>41</sup>, através do recobrimento de partículas de sílica com a fase CTA-I. A análise dessa fase indicou que a microcristalinidade não é essencial para o reconhecimento quiral.

A partir de então, inúmeras outras fases foram preparadas, recobrando-se partículas de sílica gel macroporosa, geralmente modificadas com grupos aminopropila, com derivados de polissacarídeos.<sup>42</sup> O suporte de sílica



proporcionou a resistência mecânica necessária para a obtenção de colunas mais eficientes e estáveis frente a modificações na composição da fase móvel.<sup>25</sup>

A Tabela 1.5 mostra algumas fases estacionárias quirais baseadas em derivados de amilose e celulose produzidas pela Diacel Chem. Ind.

OKAMOTO *et al.*<sup>43</sup> em seus estudos mostraram a eficiência das colunas de polissacarídeos na resolução óptica de agentes  $\beta$ -bloqueadores, examinando fases estacionárias quirais baseadas em trisfenilcarbamatos de celulose, onde todos os compostos estudados foram completamente resolvidos na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

Estudos realizados para investigação do mecanismo de discriminação quiral em fases estacionárias de polissacarídeos sugerem que derivados de celulose e amilose apresentam estruturas helicoidais com os grupos carbamatos e benzoatos, localizados no seu interior, e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução das misturas racêmicas está vinculada ao ajuste dos enantiômeros nas cavidades do polissacarídeo e da interação com os grupos carbamatos e benzoatos.<sup>25,36,44</sup>

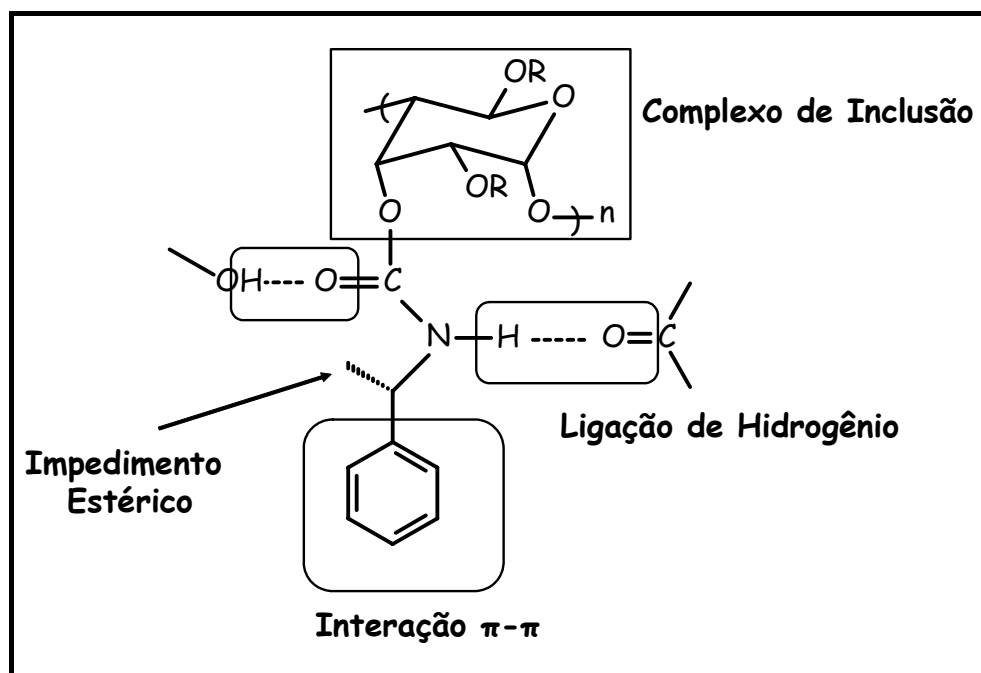
Nos derivados trisbenzoatos, os grupos carbonila dos ésteres podem interagir com enantiômeros através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo.<sup>25,30</sup> Quando há substituição no grupo fenila do trisbenzoato de celulose, a habilidade de reconhecimento quiral é grandemente influenciada pelo tipo de grupo introduzido. Derivados benzoatos tendo como substituintes doadores de elétrons, como a metila, possuem maior habilidade de reconhecimento quiral, quando comparados com substituintes aceptores de elétrons, como o cloro.<sup>25</sup>

**TABELA 1.5:** Principais fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente.<sup>25</sup>

<b>POLISSACARÍDEO</b>	<b>DERIVADO</b>	<b>NOME COMERCIAL</b>	
<b>CELULOSE</b>	Benzoato	CHIRALCEL OB CHIRALCEL OB-H	
	3,5-dimetilfenil carbamato	CHIRALCEL OD CHIRALCEL OD-H CHIRALCEL OD-R CHIRALCEL OD-RH	
	4-metilbenzoato	CHIRALCEL OJ CHIRALCEL OJ-H CHIRALCEL OJ-RH	
	4-metilfenil carbamato	CHIRALCEL OG	
	4-clorofenil carbamato	CHIRALCEL OF	
	Cinimato	CHIRALCEL OK	
	Fenil carbamato	CHIRALCEL OC	
	<b>AMILOSE</b>	3,5-dimetilfenil carbamato	CHIRALPAK AD CHIRALPAK AD-H CHIRALPAK AD-RH
		(S)- $\alpha$ -metilbenzil carbamato	CHIRALPAK AS CHIRALPAK AS-H CHIRALPAK AS-RH

A denominação "H" significa fase estacionária preparada com sílica de 5 $\mu$ m. A denominação "R" é referente ao uso da coluna no modo reverso de eluição.

Nos derivados trisfenilcarbamatos, os enantiômeros podem interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O e interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. As interações  $\pi$ - $\pi$  entre o grupo fenila da fase estacionária e grupos aromáticos do soluto quiral devem ser consideradas, embora sejam menos expressivas que as interações polares (Figura 1.6).<sup>25,30,36,44</sup>



**FIGURA 1.6:** Representação das possíveis interações do carbamato com compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose.

A unidade estrutural do carbamato tem sido considerada o sítio de adsorção mais importante dos derivados fenilcarbamatos.<sup>45</sup>

A enantiosseletividade do trisfenilcarbamato é significativamente afetada pela natureza, posição e número de substituintes do grupo fenila. Quando grupos como metoxila ou nitro são introduzidos no anel aromático há uma diminuição de reconhecimento quiral, devido a alta polaridade. Mas quando grupos doadores de elétrons, como metila, são introduzidos na posição 3 ou 4, estes concedem alto reconhecimento quiral para muitos racematos.<sup>25,30,36,44</sup>

Sendo assim, diferentes derivados de celulose apresentam discriminações quirais distintas. Por outro lado, fases estacionárias baseadas no mesmo derivado, mas de polissacarídeos distintos (amilose ou celulose), também apresentam diferentes comportamentos dependendo do soluto.<sup>45</sup>

Essas fases, apesar de terem sido originalmente desenvolvidas para serem usadas no modo normal, também possuem poder de resolução no modo reverso de eluição. No entanto, nem sempre esses dois modos de eluição são eficazes para obter a separação desejada tendo como alternativa o modo polar orgânico. O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, 2-propanol ou ainda misturas desses solventes.<sup>25,46</sup>

Embora os fabricantes de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos recomendem colunas específicas para cada modo de eluição, *CASS et al.*<sup>47</sup> demonstraram que uma mesma coluna quiral, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, a qual foi avaliada em eluição multimodal, ou seja, nos três modos de eluição, normal<sup>d</sup>, reverso<sup>e</sup> e polar orgânico<sup>f</sup>, não perdeu performance de separação em nenhum dos modos avaliados.

Essa versatilidade quanto ao modo de eluição vem suprir a restrição quanto ao uso de solventes, uma vez que as fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos são recobertas em sílica por meio de adsorção física e esses derivados são solúveis em solventes como acetato de etila, tetraidrofurano e organo clorados, os quais não são recomendados como fases móveis para estas fases quirais.

Porém, alguns autores desenvolveram fases quirais de polissacarídeos mais estáveis, através da imobilização química do seletor quiral.

---

<sup>d</sup>Modo Normal: Fases móveis compostas de hexano-álcool, normalmente ISO ou EtOH

<sup>e</sup>Modo Reverso: Fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, normalmente ACN ou MeOH

<sup>f</sup>Modo Polar Orgânico: Fases móveis contendo 100% de solventes polares orgânicos, como ACN, MeOH, EtOH, ISO ou misturas desses solventes.

Segundo uma revisão de ALI *et al.*<sup>48</sup>, o desenvolvimento de fases estacionárias quirais imobilizadas quimicamente, possibilitam o uso de uma variedade de solventes, sendo esta a principal vantagem destas fases.

Esses dois tipos de fases são complementares umas das outras. Alguns racematos podem ser somente resolvidos nas FEQs adsorvidas enquanto outros são melhores resolvidos nas fases imobilizadas.<sup>48</sup>

Portanto, as FEQs baseadas em polissacarídeos apresentam grande versatilidade e aplicabilidade, com alto poder de discriminação quiral e reprodutibilidade, tanto em escala analítica<sup>28,49</sup> quanto preparativa.<sup>50,51</sup> Estas também são muito populares, pois podem enantiorresolver aproximadamente 95% dos racematos com sucesso,<sup>48</sup> sendo então selecionadas para a realização deste trabalho.

## 1.6 - PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica amplamente utilizada na análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos. Porém, amostras de matrizes biológicas não devem ser diretamente injetadas nas fases cromatográficas, uma vez que as proteínas presentes nos biofluidos provocam rápido entupimento da coluna cromatográfica e perda de eficiência da mesma, devido a sua adsorção acumulativa no suporte.<sup>52</sup>

A etapa de pré-tratamento das amostras biológicas é, sem dúvida, a etapa mais crítica e trabalhosa durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos de análise.

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes complexas (soro, plasma, urina e outras) requer um pré-tratamento, o qual se torna indispensável e particularmente difícil devido à complexidade destas amostras e à presença de compostos endógenos, muitas vezes presentes em concentrações maiores que do próprio analito de interesse.<sup>53</sup>

O pré-tratamento, portanto, visa obter uma amostra enriquecida com os analitos de interesse, livre da interferência de compostos endógenos e da presença de proteínas da matriz biológica,<sup>54</sup> proporcionando ao método maior seletividade e sensibilidade.<sup>55</sup>

O plasma bovino, objeto de estudo deste trabalho, é composto basicamente de 91% de água; 7% de proteínas; 1% de compostos de baixo peso molecular e uma grande variedade de sais. Praticamente todas as proteínas do sangue encontram-se no plasma, exceto a hemoglobina, a qual está majoritariamente localizada na fração celular. As proteínas plasmáticas podem ser divididas em três principais frações: albumina, globulina e fibrinogênio e suas porcentagens no plasma estão mostradas na Tabela 1.6.<sup>56</sup>

O desafio na análise de fármacos e/ou metabólitos em plasma bovino consiste principalmente em alcançar um pré-tratamento que possa eliminar as proteínas, sem que o mesmo seja sensível às variações da composição da matriz.

**TABELA 1.6:** Porcentagens de proteínas encontradas no plasma bovino.<sup>56</sup>

<b>Proteínas</b>	<b>%</b>
<b>Albumina</b>	<b>42</b>
Prealbumina	1
Albumina	41
<b>Globulina</b>	<b>56</b>
$\alpha$ -globulina	14
$\beta$ -globulina	11
$\gamma$ -globulina	31
<b>Fibrinogênio</b>	<b>2</b>

Os métodos de pré-tratamento e/ou pré-concentração de analitos presentes em amostras biológicas podem ser classificados em *off-line* e *on-line*.

### 1.6.1 - Métodos de extração *off-line*

No modo *off-line* a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Neste caso, os métodos usuais de extração são: a precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida e a extração com dispersão da matriz em fase sólida.

#### 1.6.1.1 - Precipitação de Proteínas (PP)<sup>27</sup>

A ligação existente entre o fármaco e/ou metabólito é rompida por precipitação. Esta precipitação pode ser feita por uma variedade de métodos, como: aquecimento, tratamento com ácidos, bases ou solventes orgânicos miscíveis com água, como metanol, acetonitrila e etanol. A proteína é separada após centrifugação e o sobrenadante é injetado no sistema cromatográfico, sendo o composto de interesse analisado. Embora seja um método simples e rápido de ser realizado, muitas vezes esse método pode não ser o suficiente quanto à limpeza do fluido biológico e ainda ser necessário um segundo método, além de ocorrer também uma diluição da amostra que pode atrapalhar os níveis de detecção.

#### 1.6.1.2 - Extração Líquido-Líquido (ELL)<sup>27,30,53</sup>

Consiste basicamente em uma partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente um aquoso e outro orgânico. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações, onde o principal objetivo é obtenção do soluto com máxima recuperação e com o mínimo de interferentes possível. Esse tipo de extração demanda tempo e grandes volumes de solventes orgânicos, os

quais na sua grande maioria são tóxicos, além de etapas demasiadamente complicadas que podem implicar em erros analíticos.

#### 1.6.1.3 - Extração em Fase Sólida (EFS)<sup>27,30,53,57</sup>

Este tipo de extração é, sem dúvida, uma das técnicas mais populares utilizadas no tratamento de amostras biológicas. A extração em fase sólida é realizada pela retenção seletiva dos componentes de interesse de uma matriz complexa, nas fases estacionárias utilizadas. Esta técnica emprega os mesmos princípios da cromatografia líquida. Para conseguir a seletividade desejada é necessária uma adequada seleção da fase móvel extratora. A mesma variedade de fases estacionárias que está disponível em CLAE, está disponível também para a extração em fase sólida. Sendo as fases  $C_8$  e  $C_{18}$  as mais utilizadas para o tratamento de amostras biológicas.

A extração em fase sólida apresenta como principais vantagens proporcionar boa recuperação dos analitos, eficiente separação dos interferentes, utilização de uma reduzida quantidade de solvente orgânico, pouca manipulação, sendo menos susceptível a erros.

Assim como a extração em líquido-líquido, a extração em fase sólida também apresenta desvantagens como: pode ocorrer uma adsorção irreversível dos analitos sobre as fases estacionárias ou os mesmos eluïrem durante o processo de lavagem.

#### 1.6.1.4 - Extração com Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)<sup>58</sup>

Esta técnica consiste na dispersão da matriz em fase sólida, onde uma mistura é realizada entre a amostra (que pode ser viscosa, sólida ou semi-sólida) com um suporte sólido, como sílica ( $C_8$ ,  $C_{18}$ ). Esta mistura é preparada em um almofariz, onde é pressionada mecanicamente com um pistilo de forma a



promover o rompimento e a dispersão da amostra sobre o suporte. Em uma segunda etapa, essa mistura é empacotada em uma coluna de tamanho específico, e o fármaco e/ou metabólitos é extraído com um solvente apropriado. O eluato é filtrado e injetado no sistema cromatográfico.

BARKER<sup>58</sup> mostra uma vasta aplicação desta técnica para a análise de resíduos de diversos compostos em diferentes matrizes como: tecidos de bovinos e suínos, leite, peixes, frutas e vegetais.

### 1.6.2 - Métodos *on-line*

Neste caso as amostras biológicas são injetadas diretamente no sistema cromatográfico, visando simplificar, minimizar tempo e manuseio de amostras.

Dentre os métodos atualmente empregados nas análises *on-line* podemos citar os que utilizam suportes cromatográficos diferenciados, entre eles, grandes partículas (LPS - Large Particles Supports) e os meios de acesso restrito (RAM - Restricted Access Media). Estes diferentes suportes têm em comum a propriedade de excluir as macromoléculas, enquanto que os analitos são retidos nos poros das sílicas por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas.<sup>55</sup>

#### 1.6.2.1 - Fases LPS (Large Particles Supports)<sup>55,59</sup>

Estes suportes de extração são empacotados com partículas de diâmetro 30-50  $\mu\text{m}$ , o que permite alta vazão da fase móvel, sem aumento de pressão do sistema cromatográfico. Nestas condições há uma rápida eluição das proteínas e outros compostos endógenos hidrofílicos, enquanto o analito é retido nos sítios hidrofóbicos do suporte. Esta técnica de extração foi patenteada em 1997 por QUINN e TAKAREWSKI<sup>60</sup> com o nome de cromatografia de vazão turbulenta.

Os suportes utilizados em LPS são os mesmos utilizados nas fases estacionárias de CLAE, onde as principais diferenças entre elas são o tamanho das partículas e o diâmetro das colunas.

SOUVERAIN<sup>55</sup> e MULLETT<sup>59</sup> mostram uma vasta aplicação para este tipo de extração, com diversos compostos e diferentes matrizes biológicas.

#### **1.6.2.2 - Fases RAM (Restricted Access Media)**

Estas fases permitem a injeção direta de amostras biológicas, pois excluem macromoléculas e retêm micromoléculas. O princípio fundamental destas fases é a existência de regiões hidrofóbicas que retêm e separam o analito, e regiões hidrofílicas que excluem as macromoléculas no volume morto da coluna, sem acumulação destrutiva.

As fases de acesso restrito possuem uma barreira de difusão física e outra química, unindo o princípio de cromatografia de exclusão e de fase reversa para produzir uma cromatografia de superfície discriminante.<sup>61</sup>

As macromoléculas podem ser excluídas por uma barreira física que está relacionada ao diâmetro do poro e/ou por uma barreira de difusão química, criada por uma rede de proteínas ou polímeros na superfície externa da partícula<sup>61,62</sup> (Figura 1.7).

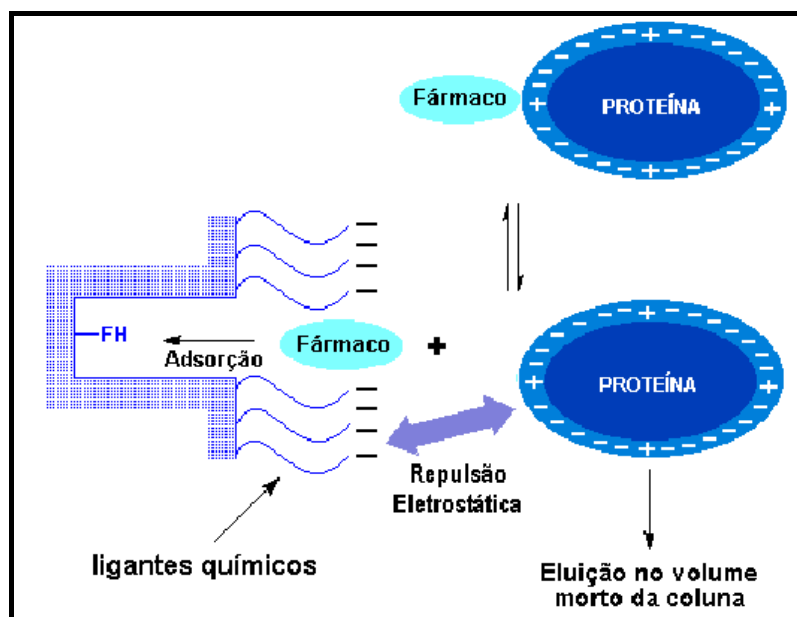


FIGURA 1.7: Mecanismo cromatográfico das fases RAM; FH: Fase Hidrofóbica<sup>63</sup>

Com relação a topografia da superfície quimicamente ligada, as fases RAM são classificadas em dois grupos: fases de superfície unimodal e fases de superfície bimodal.<sup>61</sup>

As fases de superfície unimodal são caracterizadas por apresentarem a cobertura da sílica homogênea, isto é, tanto a superfície externa quanto os poros possuem grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos.<sup>61</sup> Neste grupo estão incluídas a SHP - Shielded Hydrophobic Phase e Mixed-Function Material - MFP.

#### 1.6.2.2.1 - Fases SHP (Shielded Hydrophobic Phase)

Em 1988, GISCH *et al.*<sup>64</sup> introduziram comercialmente a fase SHP com o nome de Hisep®, onde o material de empacotamento consistia de polímeros de polioxietileno (regiões hidrofílicas) contendo anéis aromáticos (regiões hidrofóbicas), ligados tanto a superfície externa quanto interna dos poros da sílica.

#### 1.6.2.2.2 - Fases MFP (Mixed-Functional Material)

A MFP, desenvolvida por HAGINAKA *et al.*<sup>65,66</sup> consiste em uma fase, onde grupos hidrofóbicos (fenila, butila ou octila) e hidrofílicos (diol) são ligados tanto na superfície externa quanto interna da sílica.

Esses materiais combinam diferentes modos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de exclusão e de afinidade) ou diferentes funcionalidades (ligantes hidrofílicos e hidrofóbicos) sobre uma superfície uniforme da sílica.

Já, as fases de superfície bimodal possuem uma topoquímica dual, a qual é caracterizada pela presença de uma região externa hidrofílica e outra interna hidrofóbica. Aqui estão agrupadas as fases ISPR, ADS, SPS e as fases reversas com proteínas imobilizadas.

#### 1.6.2.2.3- Fases ISPR (Internal Surface Reversed Phase)<sup>67</sup>

HAGESTAM e PINKERTON<sup>67</sup>, em 1985 mostraram a primeira fase ISPR para injeção direta de fluidos biológicos, sem acumulação destrutiva de proteínas. A superfície interna dos poros da sílica foi coberta com um tripeptídeo hidrofóbico, a glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina (GFF), e a superfície externa com grupos glicina, hidrofílicos. Mas devido à baixa cobertura do interior dos poros pelos polipeptídeos, alguns compostos eram pouco retidos.

Com modificações sintéticas, realizadas no processo de obtenção original, foi desenvolvida uma outra geração destas fases, denominadas GFF II, que permitiu um recobrimento maior da superfície interna dos poros pelos peptídeos, resultando em um aumento na seletividade, capacidade de retenção e eficiência.<sup>61</sup>

#### 1.6.2.2.4 - Fases ADS (Alquil-Diol-Sílica)

As fases ADS foram desenvolvidas por BOOS *et al.*<sup>68</sup> em 1991 e apresentam uma superfície externa com caráter hidrofílico (grupos dióis) e uma superfície interna hidrofóbica, devido à presença de grupos alquílicos (butila, octila, octadecila) ligados à sílica. Estas fases mostraram ser eficientes após um volume de injeção de até 100 mL de plasma. Quando comparadas às fases ISRP (GFF II) de Pinkerton, as fases ADS apresentaram maior capacidade de retenção.

Recentemente, um novo suporte ADS foi desenvolvido, com uma superfície externa com ligantes dióis. Este apresenta propriedades de troca iônica e foi denominado de XDS ("exchange diol sílica") e tem demonstrado ótima performance.<sup>55</sup>

#### 1.6.2.2.5 - Fases SPS (Semi Permeable Surface)

DESILETS *et al.*<sup>69</sup> introduziram as fases SPS, as quais são preparadas através do recobrimento da superfície de uma fase reversa (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) com um polímero (polioxietileno), formando uma camada hidrofílica, semipermeável, a qual limita o acesso das proteínas à fase hidrofóbica.

Na primeira geração das fases SPS, os polímeros eram adsorvidos a superfície externa da fase reversa, mas com a presença de solventes orgânicos, na fase móvel, estes se desprendiam do suporte após algumas análises cromatográficas levando, então, ao desenvolvimento da segunda geração dessas fases, na qual o polímero é ligado covalentemente à sílica.<sup>70</sup>

#### 1.6.2.2.6 - Fases Hidrofóbicas Imobilizadas com Proteínas

YOSHIDA *et al.*<sup>71</sup> em 1984, relataram a preparação de uma fase imobilizada com proteína, que consiste em saturar os sítios de adsorção externos da sílica (no caso C<sub>18</sub>) com proteínas desnaturadas. A superfície externa desta

fase é hidrofílica, permitindo a exclusão de proteínas, já os poros são hidrofóbicos o suficiente para reter as micromoléculas (fármacos e/ou metabólitos).

Nesta mesma classe, também estão incluídas as fases desenvolvidas por MENEZES *et al.*<sup>72-74</sup>, onde suportes de sílica (C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>) são recobertos com albumina sérica bovina (BSA), ou humana (HSA), e estabilizadas através de ligações cruzadas com glutaraldeído, bem como as fases de sílica ou aminopropil-sílica conjugada com avidina.<sup>75</sup>

Recentemente, FELIX e CAMPÊSE<sup>76</sup> desenvolveram uma nova coluna RAM-BSA quiral para análise dos fármacos oxazepam, lorazepam, temazepan, lormetazepan, em plasma humano. A superfície interna da nova fase RAM é composta do seletor quiral de  $\beta$ -ciclodextrina e a superfície externa com BSA. Neste trabalho, foram obtidos excelentes resultados para a exclusão protéica e para a enantiosseletividade dos fármacos. A extensão para outros seletores quirais está sendo realizada, como  $\alpha$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas e antibióticos.

Em geral, o uso de colunas RAM oferece várias vantagens em relação aos métodos de pré-tratamento *off-line*, entre elas a eliminação de várias etapas no pré-tratamento (precipitação de proteínas, centrifugação, evaporação do solvente, filtração), diminuindo erros humanos de manipulação e perdas do analito; é totalmente compatível com sistemas automatizados, evitando manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumenta significativamente o número de análises por tempo.<sup>52,55,59</sup>

## 1.7 - MÉTODOS EMPREGADOS PARA DETERMINAÇÃO DO ALBENDAZOL E/OU METABÓLITOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

O uso de CLAE permite o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, precisos e específicos, os quais são adequados para a aplicação em estudos relacionados à farmacocinética e à farmacodinâmica de fármacos.

Dentro deste contexto, diversos trabalhos utilizando CLAE, com diferentes fases estacionárias, diferentes condições cromatográficas e extensivos preparos de amostras, têm sido reportados para a análise e quantificação de compostos benzimidazólicos em fluidos biológicos.

De maneira geral, o uso de fases quimicamente ligadas ( $C_8$ ,  $C_{18}$  e fenil) e em alguns trabalhos, o uso de fases estacionárias quirais; o uso de fases móveis constituídas de solução tampão com diferentes valores de pH, o uso de detecção no ultravioleta e fluorescência são encontrados na maioria dos trabalhos. Todas as etapas de pré-tratamento das matrizes biológicas, para extração dos analitos, foram bastante extensivas, onde normalmente utilizou-se extração em fase sólida ou extração líquido-líquido.

Cabe ressaltar que vários métodos para análise de albendazol e/ou metabólitos estão descritos,<sup>19,20,22,24,77-87</sup> (Tabela 1.7), porém nenhum deles faz uso de extração *on-line*.

TABELA 1.7: Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Continua)

Composto	Matriz Biológica	Fase Estacionária	Pré-Tratamento das Amostras	Deteccção	Ref
(+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO	Plasma Humano	CA: Chiralcel OB-H (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: Ciano (4 x 4 mm)	Extração líquido-líquido	$\lambda_{exc}$ = 280 nm $\lambda_{em}$ = 320 nm	77
(±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Leite	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	Extração líquido-líquido	$\lambda_{exc}$ = 290 nm $\lambda_{em}$ = 320 nm	78
(+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma Humano	CA: Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, 10 µm) PC: Ciano (4 x 4 mm)	Extração líquido-líquido	$\lambda_{exc}$ = 280 nm $\lambda_{em}$ = 320 nm	19
ABZ, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma de Ratos	CA 1: Kromasil ODS (200 x 4,6 mm, 5 µm) CA 2: Chiral-AGP (100 x 4,0 mm, 5 µm)	Precipitação de proteínas com 2,0 mL de metanol seguida de filtração	$\lambda$ = 291 nm	22

Ref: Referência Bibliográfica; PC: Pré-coluna; CA: Coluna analítica;  $\lambda_{exc}$ : excitação;  $\lambda_{em}$ : emissão para deteção no fluorescência e  $\lambda$  para deteção no ultravioleta.



**TABELA 1.7:** Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Continua)

<b>Composto</b>	<b>Matriz Biológica</b>	<b>Fase Estacionária</b>	<b>Pré-Tratamento das Amostras</b>	<b>Deteccção</b>	<b>Ref</b>
ABZ, (+)-ABZ-SO (-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub>	Microssomas de Parasitas	CA: Chiral-AGP (100 x 4,0 mm d.i., 5 µm)	Extração em fase sólida	λ= 292 nm	79
ABZ, (±)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma, bile, fluido do abomaso e intestino de bovinos	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	Extração em fase sólida	λ= 292 nm	24
ABZ, (±)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma Humano	CA: Fenil (300 x 3,9 mm, 10 µm)	Extração em fase sólida	λ= 295 nm	20
(+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma Humano	CA: Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, 5 µm) PC: Ciano (4,0 x 4,0 mm)	Extração líquido-líquido	λ <sub>exc</sub> = 280 nm λ <sub>em</sub> = 320 nm	80

Ref: Referência Bibliográfica; PC: Pré-coluna; CA: Coluna analítica; λ<sub>exc</sub>: excitação; λ<sub>em</sub>: emissão para deteção no fluorescência e λ para deteção no ultravioleta.

**TABELA 1.7:** Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Continua)

<b>Composto</b>	<b>Matriz Biológica</b>	<b>Fase Estacionária</b>	<b>Pré-Tratamento das Amostras</b>	<b>Deteccção</b>	<b>Ref</b>
(±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Soro Humano	CA: C <sub>8</sub> (100 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: C <sub>8</sub> (3,0 x 4,6 mm)	Extração líquido-líquido	λ = 292 nm λ <sub>exc</sub> = 280 nm λ <sub>em</sub> = 320 nm	81
ABZ, (±)-ABZ-SO ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Tecidos de diferentes espécies de peixe	CA: C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: C <sub>18</sub> (4,0 x 3,0 mm)	Extração líquido-líquido	λ <sub>exc</sub> = 290 nm λ <sub>em</sub> = 330 nm	82
ABZ, (±)-ABZ-SO ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Tecidos de diferentes espécies de peixe	CA: C <sub>18</sub> (300 x 3,9 mm, 10 µm) PC: C <sub>18</sub> (4,0 x 3,0 mm)	Extração líquido-líquido	λ <sub>exc</sub> = 290 nm λ <sub>em</sub> = 330 nm	83
(±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Sêmen de carneiros	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) PC: Nucleosil (8,0 x 4,0 mm)	Extração líquido-líquido	λ <sub>exc</sub> = 290 nm λ <sub>em</sub> = 320 nm	84

Ref: Referência Bibliográfica; PC: Pré-coluna; CA: Coluna analítica; λ<sub>exc</sub>: excitação; λ<sub>em</sub>: emissão para deteção no fluorescência e λ para deteção no ultravioleta.

**TABELA 1.7:** Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Continua)

<b>Composto</b>	<b>Matriz Biológica</b>	<b>Fase Estacionária</b>	<b>Pré-Tratamento das Amostras</b>	<b>Deteccção</b>	<b>Ref</b>
(±)-ABZ-SO ABZ-SO <sub>2</sub> ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Plasma de carneiros	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: C <sub>8</sub> (8,0 x 4,0 mm)	Extração líquido-líquido	$\lambda_{exc}$ = 290 nm $\lambda_{em}$ = 330 nm	17
(±)-ABZ-SO ABZ-SO <sub>2</sub>	Plasma de carneiros	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: C <sub>18</sub> (3,0 x 4,6 mm)	Extração em fase sólida	$\lambda$ = 292 nm	23
(±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Músculo, rim fígado, gordura	CA: C <sub>18</sub> (250 x 3,9 mm, 10 µm)	Extração líquido-líquido	$\lambda_{exc}$ = 290 nm $\lambda_{em}$ = 320 nm	85
ABZ, (±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> , sulfóxido e sulfona de fenbendazol e de oxbendazol	Plasma e amostras fecais de asnos	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) PC: C <sub>18</sub> (3 x 2 mm)	Extração líquido-líquido	$\lambda$ = 292 nm	86

Ref: Referência Bibliográfica; PC: Pré-coluna; CA: Coluna analítica;  $\lambda_{exc}$ : excitação;  $\lambda_{em}$ : emissão para deteção no fluorescência e  $\lambda$  para deteção no ultravioleta.

**TABELA 1.7:** Métodos por CLAE para a determinação do albendazol e/ou metabólitos em fluidos biológicos

<b>Composto</b>	<b>Matriz Biológica</b>	<b>Fase Estacionária</b>	<b>Pré-Tratamento das Amostras</b>	<b>Deteccção</b>	<b>Ref</b>
ABZ, (±)-ABZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , mebendazol, mebendazol-hidroxi, tiabendazol, oxbendazol, flubendazol, flubendazol-amino, fenbendazol-sulfóxido e fenbendazol-sulfona	Plasma de carneiros	CA: C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) PC: C <sub>8</sub> (8,0 x 4,0 mm)	Extração líquido-líquido, seguida de extração em fase sólida	λ= 298 nm	87

Ref: Referência Bibliográfica; PC: Pré-coluna; CA: Coluna analítica; λ<sub>exc</sub>: excitação; λ<sub>em</sub>: emissão para deteção no fluorescência e λ para deteção no ultravioleta.

# *OBJETIVOS*

## 2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1 - O preparo de colunas de acesso restrito (RAM), de albumina sérica bovina, imobilizadas em dois diferentes suportes:  $C_8$  e  $C_{18}$ ;

2 - A avaliação da eficiência das colunas RAM-BSA preparadas para a exclusão das proteínas do plasma bovino;

3 - A síntese de dois metabólitos do albendazol, o albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona através do emprego do complexo aquo-(N-óxido de piridina) oxo diperoxo de molibdênio (VI) -  $MoO_5(OPi)(H_2O)$ ;

4 - O desenvolvimento de um método para a quantificação dos metabólitos do albendazol, em plasma bovino, através do emprego de CLAE multidimensional, que possa ser utilizado em estudos enantiosseletivos para acompanhamento farmacocinético dos compostos, através de diferentes vias de administração do fármaco.

*PARTIE*  
*EXPERIMENTAL*

## 3 - PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 - GENERALIDADES

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto por duas bombas LC 10-ATvp, válvula seletora de solvente FCV-10 ALvp, degaseificador de membrana SHIMADZU DGU-14 A, detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD-10Avp, detector de fluorescência RF 10Axl, auto-injetor SIL 10-ADvp, forno CTO 10Svp e válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 para o acoplamento das colunas. O equipamento apresentava-se acoplado a uma interface SCL-10 Avp e os cromatogramas foram registrados através de um *software* CLASS-VP.

A separação semipreparativa foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto de uma bomba modelo LC-6AD acoplada a um detector de ultravioleta, de comprimento de onda variável, SPD-10AV, injetor manual RHEODYNE 7725i com alça dosadora de 500  $\mu$ L. O equipamento apresentava-se ligado a uma interface CBM SCL-10A e os cromatogramas foram registrados através de um *software* CLASS-VP.

Uma empacotadora SHANDON foi empregada para empacotar as fases estacionárias.

As medidas de absorção molecular, na região do UV-visível, foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HP 8452A, com uma cela de vidro de 1 cm de caminho óptico.



O sinal de rotação óptica dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido foi determinado através de um polarímetro PERKIN ELMER 241

As análises elementares foram realizadas no DQ-UFSCar, utilizando-se um equipamento FISIONS EA 1108.

Os espectros no infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro BOMEN-MICHELSON FT-IR, modelo Power Male 1 - Ultrasync.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de Carbono ( $^{13}\text{C}$ ) foram adquiridos em espectrômetro BRUKER DRX-400. O solvente utilizado foi ácido trifluoracético deuterado ( $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) comercial CIL. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência ( $\delta=0$ ). Os valores de deslocamento químico foram referidos em unidade de  $\delta$  (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

A peneira usada para a uniformização e homogeneização das fases estacionárias quirais sintetizadas foi ENDECOTT SBS 410/1986 (995308) com orifícios de 38  $\mu\text{m}$ .

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram todos grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA). Os solventes e soluções tampão utilizados no preparo das fases móveis foram filtrados, a vácuo, em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45  $\mu\text{m}$  e, posteriormente, degaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, QUALXTRON, modelo 8010, com precisão de  $\pm 0,01$  unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON.

O aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI),  $\text{MoO}_5(\text{OPi})(\text{H}_2\text{O})$ , foi gentilmente cedido pela aluna do grupo Bianca Rebelo Lopes.

O plasma bovino utilizado neste trabalho foi gentilmente doado pela empresa "Ouro Fino Produtos Veterinários Ltda" (Ribeirão Preto-SP, Brasil).

A centrifugação do plasma bovino foi realizada em uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i termostatizada. A homogeneização das amostras foi realizada em um agitador de tubos IKA.

Para a avaliação das colunas quirais empregadas neste trabalho foram utilizados os padrões racêmicos base de Tröger, óxido de *trans*-estilbeno e 1-(9-antril)-2,2,2-trifluor - etanol todos ALDRICH

Os tempos mortos das colunas ( $t_0$ ) foram determinados com 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (ACROS) quando a eluição foi no modo normal e acetonitrila no modo reverso de eluição.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a enantioseletividade foram:

$$k_1=(t_1-t_0)/t_0; k_2=(t_2-t_0)/t_0; \alpha=:k_2/k_1; R_s=1,18(t_2-t_1)/(w_2+w_1)$$

Onde  $t_0$  é o tempo morto da coluna,  $t_1$  e  $t_2$  representam os tempos de retenção,  $k_1$  e  $k_2$  são os fatores de retenção,  $w_1$  e  $w_2$  são as larguras da primeira e segunda banda cromatográfica medidas a meia altura,  $\alpha$  é o fator de separação e  $R_s$  é o fator de resolução.

Os demais reagentes químicos utilizados foram de diferentes marcas:

- Albumina sérica bovina (fraction V powder minimum 98%) SIGMA;
- Fosfato de potássio monobásico J.T. BAKER;
- Glutaraldeído 25% ACROS;
- Boroidreto de sódio da MERCK;
- Ácido fosfórico concentrado J. T. BAKER;
- Corante Comassie Brilliant Blue da MALLINCKRODT;
- Amilose comercial SIGMA;
- Os isocianatos de arila foram comerciais ACROS;
- 3-aminopropiltrietóxisilano foi comercial ACROS;
- Sílica Nucleosil MACHEREY-NAGEL (500Å, 7µm);
- Hidróxido de potássio SYNTH;
- Albendazol-2-amino-sulfona 98%, LAN AESER

### 3.2 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ALBENDAZOL

Na reação de oxidação do albendazol, 327,0 mg (1,13 mmol) do complexo  $\text{MoO}_5(\text{OPi})(\text{H}_2\text{O})$  foram adicionados lentamente, com o auxílio de um adicionador de sólidos, durante um período de 20 minutos, a uma solução de albendazol (300,0 mg; 1,13 mmol) em 30,0 mL de metanol/acetoneitrila (1:5 v/v) à temperatura ambiente. A reação foi mantida a temperatura ambiente, sob constante agitação e acompanhada por cromatografia em camada delgada, utilizando-se como eluente diclorometano/acetona (60:40 v/v), e quando não mais se observou material de partida esta foi, então, cessada.

Para a extração foi adicionado ao meio reacional uma solução saturada de bicarbonato de sódio e posteriormente a extração foi realizada com

diclorometano, em triplicata, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador.

O produto da reação foi obtido como um sólido amarelo, com 87% de rendimento.

Os produtos da oxidação foram separados e purificados por cromatografia em coluna de bancada, utilizando-se para isso sílica do tipo flash e diclorometano:acetona (60:40 v/v) como fase móvel. As frações coletadas foram rotaevaporadas e obteve-se dois produtos: um sólido branco (185,0 mg), o albendazol-sulfóxido e um sólido amarelo (49,0 mg) o albendazol-sulfona.

#### **(A) Albendazol-sulfóxido: $C_{12}H_{15}N_3O_3S$**

##### **Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=51,19; %H=5,33; %N=14,93; %S=11,37

Valores Experimentais: %C=51,25; %H=4,82;%N=14,65; %S=12,29

Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1026,7

$^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , ppm): 1,19 (t, 3H); 1,86 (sext, 2H); 3,30 (ddt, 2H); 4,1 (s, 3H); 7,92 (dd, 1H); 8,01 (d, 1H) e 8,32 (d, 1H).

$^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , ppm): 13,5; 18,4; 57,1; 59,9; 113,7; 117,4; 125,4; 131,1; 133,5; 139,2; 148,2 e 156,0

#### **(B) Albendazol-sulfona: $C_{12}H_{15}N_3O_4S$**

##### **Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=48,47; %H=5,08; %N=14,13; %S=10,78

Valores Experimentais: %C=48,24; %H=5,41;%N=13,46; %S=10,89

Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1133,6; 1256,0

$^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , ppm): 1,10 (t, 3H); 1,87 (sext, 2H); 3,43 (t, 2H); 4,13 (s, 3H); 8,19 (dd, 1H); 8,03 (d, 1H) e 8,47 (d, 1H).

$^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , ppm): 13,8; 18,9; 57,7; 61,0; 117,3; 117,6; 128,6; 131,2; 135,2; 138,0; 149,6 e 156,3.

### 3.3 - FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

#### 3.3.1 - Síntese das fases estacionárias quirais de celulose e amilose

Piridina anidra (50 mL) foi adicionada ao polissacarídeo, celulose ou amilose (1,00 g; 6,17 mmol), previamente seco em estufa à vácuo a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas. A mistura reacional foi aquecida a  $98^\circ\text{C}$  sob constante agitação. Depois de 24 horas, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 3,5 equivalentes do isocianato correspondente (21,6 mmol). A reação permaneceu sob aquecimento e agitação por mais 72 horas à mesma temperatura.

Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado, sob agitação em metanol (300 mL). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e, então, o produto branco foi filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, repetidas vezes, até que não se observasse mais resíduos de piridina.

O carbamato foi seco em dessecador com vácuo, por 72 horas, e caracterizado por análise elementar e infravermelho.

**(A) tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose:  $C_{33}H_{37}O_8N_3$**

**Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=65,66; %H=6,18; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=64,53; %H=6,46;%N=6,24

**Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3386,1; 1726,6 e 1221,0**

**(B) tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose:  $C_{33}H_{37}O_8N_3$**

**Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=65,66; %H=6,18; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=65,35; %H=6,15;%N=6,84

**Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3313,5; 1749,3 e 1224,7**

**(C) tris(3,5-dimetóxilfenilcarbamato) de amilose:  $C_{33}H_{37}O_{14}N_3$**

**Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=56,65; %H=5,29; %N=6,00

Valores Experimentais: %C=54,82; %H=5,46;%N=5,95

**Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3340,4; 1748,0 e 1202,0**

**(D) tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose:  $C_{33}H_{37}O_8N_3$**

**Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=65,66; %H=6,18; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=60,10; %H=5,60; %N=6,58

**Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3324,2; 1717,9 e 1242,3**

### 3.3.2 - Derivatização do suporte 3-aminopropilsílica:

Sílica Nucleosil (500 Å, 7µm) (20,0 g), previamente seca em estufa à vácuo a 60°C por 24 horas e, depois, mantida sob atmosfera de cloreto de lítio em dessecador por mais 24 horas, foi transferida para um balão, onde tolueno seco (360 mL) foi adicionado. A mistura foi mantida sob atmosfera de N<sub>2</sub>, e adicionou-se 3-aminopropiltrietóxi-silano (24 mL, 102 mmol). A mistura reacional permaneceu em agitação e aquecimento a uma temperatura de 120°C, durante 3 horas.

O produto branco formado foi filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com tolueno (300 mL) e depois com mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v) (250 mL). O produto foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas e submetido à análise elementar.

#### Análise Elementar:

Sílica Nucleosil: %C = 0,13; %H = 0; %N = 0,18

Sílica APS-Nucleosil: %C = 1,39; %H = 0,56; %N = 0,61

### 3.3.3 - Cobertura do carbamato ao suporte APS-Nucleosil

Sílica (2,0 g) APS-Nucleosil foi transferida para um balão especial para revestimento, com reentrâncias, ao qual foi adicionado tetraidrofurano (50 mL). Refluxou-se a suspensão por meia hora, resfriou-se o sistema à temperatura ambiente e, então se adicionou, em pequenas porções, o carbamato (0,5 g) previamente dissolvido em uma mistura de tetraidrofurano:N,N-dimetilacetamida (7:3).

Os solventes foram evaporados muito lentamente em rotaevaporador e a fase estacionária obtida, foi totalmente seca em bomba a vácuo. Após a secagem, a fase estacionária foi cuidadosamente peneirada,

utilizando uma peneira especial com orifício de 38  $\mu\text{m}$ , para a uniformização do tamanho das partículas.

### **3.3.4 - Empacotamento das fases estacionárias**

#### **3.3.4.1 - Colunas Analíticas**

As fases estacionárias quirais (2,4 g) foram empacotadas em coluna de aço inoxidável (15,0 x 0,46 mm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como solvente. As fases estacionárias foram suspensas em 50,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v) e agitadas no ultra-som por um período de três minutos. A fase estacionária tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose foi suspensa em hexano:nujol (3:2 v/v)

As colunas foram condicionadas em hexano:isopropanol (90:10 v/v) durante 12 horas, utilizando-se um vazão de 0,5 mL/min e posteriormente avaliadas com os padrões cromatográficos.

#### **3.3.4.2 - Coluna Semipreparativa**

A cobertura do suporte foi realizada como descrito anteriormente no item 3.3.3, utilizando-se 2,0 g de carbamato e 8,0 g de sílica APS-Nucleosil (500Å, 7 $\mu\text{m}$ ).

A fase estacionária quiral (9,0 g) foi empacotada em coluna de aço inoxidável (20,0 x 0,70 cm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como solvente. A fase estacionária foi suspensa em 70,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v) e agitadas no ultra-som por um período de três minutos.

Após empacotamento a coluna foi condicionada em hexano:isopropanol (90:10 v/v) durante 12 horas, utilizando-se uma vazão de 1,0 mL/min.



### 3.4 - SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ALBENDAZOL-SULFÓXIDO EM ESCALA MULTI-MILIGRAMA

A coluna semipreparativa tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose adsorvida em APS Nucleosil (500Å, 7µm, 20% g/g) (20,0 x 0,70 cm) foi condicionada com a fase móvel hexano/etanol (80:20) a vazão de 3,0 mL/min e detecção no UV em 290 nm.

Uma massa de 16,0 mg de (±)-albendazol-sulfóxido foi pesada e solubilizada em 4,0 mL de metanol. A solução de (±)-albendazol-sulfóxido foi injetada no sistema cromatográfico com alça dosadora de 500 µL. As frações de (+) e (-) albendazol-sulfóxido foram coletadas nas áreas demarcadas para coleta (Figura 4.46 p.132). As frações obtidas foram rotaevaporadas e os sólidos obtidos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica para determinação da pureza enantiomérica.

### 3.5 - PREPARO DAS COLUNAS RAM-BSA

#### 3.5.1 - Sílicas Utilizadas

As sílicas utilizadas no empacotamento das colunas foram: octilsílica LUNA (100 Å, 10 µm) e octadecilsílica LUNA (100 Å, 10 µm).

#### 3.5.2 - Empacotamento das Colunas

A sílica de fase hidrofóbica (1,3 g) foi suspensa em 50 mL metanol, homogeneizada no ultra-som durante 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5,0 x 0,46 cm d.i.). As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 4 horas a uma vazão de 1,0 mL/min.

### 3.5.3 - Imobilização das Fases Hidrofóbicas com BSA

Após o empacotamento das fases hidrofóbicas e condicionamento das colunas, estas foram eluídas, a uma vazão de 1,0 mL/min, com solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M; pH 6,0) durante 20 minutos, solução de albumina sérica bovina 1,0 mg/mL preparada em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M; pH 6,0), durante 30 minutos, água por 20 minutos e em seguida eluiu-se três frações de 7 mL de glutaraldeído a 25% (v/v). Após um repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio 1,0 g/mL foi eluída pela coluna até obtenção de um eluente com valor de pH 10. Após mais 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 minutos e guardada em geladeira.

## 3.6 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA BOVINO PELAS COLUNAS RAM-BSA

### 3.6.1 - Determinação de Proteínas Totais em Plasma Bovino - Método de Bradford<sup>88</sup>

#### 3.6.1.1 - Preparo do Reagente de Bradford

A solução do corante azul brilhante, *Coomassie Brilliant Blue*, foi preparada na concentração de 100 mg/mL, segundo o procedimento descrito por BRADFORD<sup>88</sup>. Em um béquer, dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante em 25 mL de etanol e a seguir acrescentou-se 50 mL de ácido fosfórico (85 % P.A.). Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

#### 3.6.1.2 - Preparo das Amostras

Após o condicionamento da coluna RAM com água a 1,0 mL/min durante 30 minutos, injetou-se 50  $\mu\text{L}$  de plasma bovino, previamente

centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, elui-se com água e coletou-se a primeira e a segunda fração de 2 minutos separadamente, em dois balões volumétricos. Em seguida, a coluna foi eluída com ACN/ÁGUA/ISO (75/15/10 v/v/v) por 5 minutos 1,0 mL/min, para a limpeza de lipídios e compostos endógenos, e condicionada com água por 10 minutos.

Este procedimento foi repetido para volumes de 100 e 200  $\mu\text{L}$ , em triplicata para todos os volumes de injeção. As frações coletadas foram transferidas para frascos de vidro âmbar e submetidas a medidas espectrofotométricas.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$  de plasma bovino, também centrifugado, em balão volumétrico de 2,00 mL e completando-se o volume com água. As soluções de referência não foram eluídas pelas colunas RAM-BSA e representaram 100% das proteínas presentes no plasma bovino.

### **3.6.1.3 - Medidas Espectrofotométricas das Amostras**

Pipetou-se 250  $\mu\text{L}$  da fração eluída da coluna, adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de BRADFORD, e com constante agitação, deixou reagir por 3 minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o espectro na região de 190 a 820 nm. Atenção foi dada ao comprimento de onda 596 nm, relativo à máxima absorbância do complexo proteína-corante. As absorbâncias foram medidas contra um branco de água.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as frações coletadas, bem como para as soluções de referência.

### 3.7 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

#### 3.7.1 - Preparo das soluções padrão do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO

Foram preparadas, individualmente, três soluções estoque em metanol na concentração de 1,0 mg/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e para ABZ-SO<sub>2</sub> e de 8,0 mg/mL para o (±)-ABZ-SO, através da dissolução de 2,0 mg e 16,0 mg, respectivamente, em balões volumétricos de 2,0 mL.

A partir destas três soluções, foram obtidas, por diluição, duas soluções estoque com os compostos combinados nas concentrações: (1) 5,0 µg/mL para ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 5,0 µg/mL para ABZ-SO<sub>2</sub> e de 40,0 µg/mL para o (±)-ABZ-SO; (2) 160,0 µg/mL para ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 160,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> e de 1280 µg/mL para (±)-ABZ-SO. As soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas por diluição das soluções estoque (1) e (2). Onde a solução estoque (1) foi utilizada para preparar as soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais baixas e a solução estoque (2) foi utilizada para preparar as soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais altas.

Solução padrão de calibração: 100,0; 150,0; 200,0; 300,0; 400,0; 800,0; 1600 e 3200 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e também para o ABZ-SO<sub>2</sub> e de 800,00; 1200,00; 1600,00; 2400,0; 3200,0; 6400,0; 12800 e 25600 ng/mL para o (±)-ABZ-SO.

Solução padrão de controle de qualidade: 240,0; 1500 e 3000 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 120,0; 1500 e 3000 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>; 960,00; 10000 e 20000 ng/mL para o (±)-ABZ-SO

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação ao ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação ao ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

### **3.7.2 - Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade**

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da solução padrão apropriada foram pipetadas em tubos para centrifugação (15 mL) e o solvente foi evaporado sob ar comprimido. Os analitos foram reconstituídos em plasma bovino (500  $\mu\text{L}$ ) e homogeneizadas em vórtex, por 10 s. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 20°C.

Alíquotas de 350  $\mu\text{L}$  foram transferidas para os *vials* do autoinjeter, tendo sido injetado um volume de 200  $\mu\text{L}$  no sistema multidimensional de CLAE.

Na seqüência, injetaram-se amostras de plasma bovino, livres da presença dos compostos avaliados, o que caracterizava o branco do plasma bovino, cujo preparo foi similar ao anterior descrito.

### **3.7.3 - Obtenção das curvas analíticas**

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 10,00; 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 80,00; 160,0; 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 80,00; 160,0; 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub> e de 80,00; 120,0; 160,0; 240,0; 320,0; 640,0; 1280; 2560 ng/mL para o ( $\pm$ )-ABZ-SO.

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos

compostos. Foi considerado um mínimo de seis diferentes concentrações em cada curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção das curvas analíticas: Temperatura de 30°C

**Bomba 1:**

**0,00-5,00 min:** fase móvel: 100% tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5) [exclusão das proteínas pela coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 1,0 mL/min

**5,01-14,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (extração dos compostos da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 0,5 mL/min

**8,00-14,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) [transferência dos compostos da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA para a coluna analítica]; vazão de 0,5 mL/min

**14,01-25,00 min:** fase móvel: ACN:ÁGUA:ISO (75:15:10 v/v/v) (limpeza da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

**25,01-35,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5) (condicionamento da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

**Bomba 2: vazão de 0,5 mL/min;**

**0,00-8,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) [condicionamento da coluna analítica tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.)];

**8,00-14,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (transferência dos compostos da coluna extratora para a coluna analítica);

**14,01-35,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (análise do ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , ABZ- $\text{SO}_2$  e ( $\pm$ )-ABZ-SO), detecção Fluorescência Excitação: 290 nm e Emissão: 320 nm

### **3.8 - PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

#### **3.8.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada através de amostras de plasma bovino isenta dos compostos ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , ABZ- $\text{SO}_2$  e ( $\pm$ )-ABZ-SO. Em cada seqüência de análises procedeu-se a injeção em triplicata das amostras de plasma bovino previamente centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min a 20°C sem adição dos analitos.

#### **3.8.2 - Recuperação**

A eficiência de extração dos analitos da matriz biológica foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em replicatas (n=5).

Calculou-se o percentual de eficiência da extração das colunas RAM, por comparação dos resultados obtidos para as amostras controle, preparadas em plasma bovino, com os obtidos com as amostras preparadas na fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (n=5).

#### **3.8.3 - Precisão e exatidão**

A precisão intradia e interdia e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, as quais foram preparadas em replicata (n=5) em plasma bovino. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações

encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

A exatidão do método foi também avaliada através do teste cego, onde foram preparadas, em triplicata, e analisadas, duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista.

#### **3.8.4 - Limite da quantificação (LQ) e detecção (LD)**

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV), não excedeu o valor de 20 % (n = 5) e a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 20 % do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

#### **3.8.4 - Testes de Estabilidade**

A estabilidade das amostras foi verificada através da determinação das concentrações das amostras analisadas por interpolação com a curva de calibração. A precisão e exatidão obtidas nestas análises determinaram a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram variabilidade de até 15%, conforme critério de aceitação do método. A estabilidade das amostras controle de qualidade do método foi verificada, preparadas em triplicata como descrito no item 3.7.2, através da comparação dos resultados obtidos de amostras recém-preparadas com aqueles obtidos, após um teste específico.

Paralelamente, a matriz biológica foi submetida aos mesmos testes de estabilidade.



#### **3.8.4.1 - Estabilidades durante ciclos de degelo**

As amostras de plasma fortificadas com os metabólitos do albendazol, recém preparadas, foram analisadas, e posteriormente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após um período de 24 horas, as amostras foram degeladas à temperatura ambiente e novamente analisadas. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, sempre em intervalos de 24 horas para cada ciclo. Os degelos foram realizados à temperatura ambiente.

#### **3.8.4.2 - Estabilidade de longa duração**

As amostras de plasma fortificadas com os metabólitos do albendazol, recém preparadas, foram analisadas, e posteriormente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após um período de 24, 48, 72 horas, 7, 14 dias, as amostras foram degeladas a temperatura ambiente e novamente analisadas. Os degelos foram realizados à temperatura ambiente e uma única vez.

#### **3.8.4.3 - Estabilidade de curta duração**

As amostras foram preparadas, analisadas recém-preparadas e após mantidas à temperatura ambiente por 6 horas. O período de 6 horas foi baseado no tempo excedente de duração do preparo das amostras para as injeções no estudo de interesse.

#### **3.8.4.4 - Estabilidades das amostras durante a permanência no auto-injetor**

As amostras foram preparadas e analisadas após serem mantidas no auto-injetor por 16 horas. O período de 16 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica.

---

---

#### **3.8.5.6 - Estabilidade da matriz biológica**

As amostras do branco de referência foram submetidas às mesmas condições dos testes realizados, e sempre analisadas antes das amostras controle, portanto, sendo submetida a todos os testes de estabilidade descritos anteriormente.

#### **3.8.5.7 - Estabilidade das amostras em solução**

A estabilidade das amostras em solução metanólica foi verificada através das amostras controle de qualidade preparadas e armazenadas a temperatura de -20°C. Em dias alternados, as amostras em solução foram preparadas em triplicata e analisadas. Esse procedimento foi repetido até que se fosse observado decaimento da concentração das amostras de 15%.

*RESULTADOS E  
DISCUSSÕES*

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ALBENDAZOL-SULFÓXIDO (ABZ-SO) E ALBENDAZOL-SULFONA (ABZ-SO<sub>2</sub>)

Reações de oxidação para obtenção de sulfóxidos ou sulfonas são importantes transformações em química orgânica. Estes compostos são usados como importantes intermediários em síntese orgânica e o método mais amplamente utilizado para a preparação de sulfóxidos e sulfonas é através da oxidação do correspondente sulfeto.<sup>89</sup>

Vários métodos têm sido reportados na literatura na obtenção desses compostos a partir de sulfetos.<sup>90-93</sup> Dentre eles, pode-se citar métodos que incluem tratamentos com halogênios<sup>90</sup>, peróxido de hidrogênio<sup>91</sup>, periodato de sódio<sup>92</sup> e ácido m-cloroperbenzóico<sup>93</sup>. A grande problemática dos métodos já descritos é que estes apresentam algumas desvantagens, como: necessitar de longos tempos reacionais; baixos rendimentos; reagentes caros; uso de fortes agentes oxidantes; meio reacional fortemente básico ou ácido e a geração de resíduos químicos tóxicos.

Desta forma, a obtenção de sulfóxidos e sulfona através de reações orgânicas que envolvam o uso de agentes oxidantes seletivos, mais baratos e que minimizem a geração de resíduos tóxicos é de grande interesse.

Estudos realizados por BATIGALHIA *et al.*<sup>94</sup> mostraram que o uso do aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI), MoO<sub>5</sub>(OPi)(H<sub>2</sub>O), para oxidações de sulfetos têm sido eficientemente empregado.

O MoO<sub>5</sub>(OPi)(H<sub>2</sub>O) (Figura 4.1) é um complexo conhecido como complexo de MIMOUM<sup>95</sup>, do tipo oxo diperoxo, coordenado a N-óxido de piridina e água.

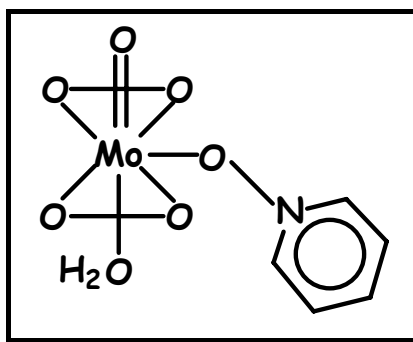


FIGURA 4.1: aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI)

Nas sínteses orgânicas realizadas com complexo de molibdênio (VI) foram observadas algumas vantagens sobre outros oxidantes, o que faz deste uma interessante alternativa para a obtenção de sulfóxidos e sulfonas. Dentre as vantagens demonstradas pelo sistema empregado por BATIGALHIA *et al.*<sup>94</sup>, pode-se relatar: o controle dos produtos de oxidação, ou seja, o método permitiu obter produtos com alta pureza do sulfóxido ou sulfona com versáteis variações das condições reacionais; o complexo apresentou excelente quimiosseletividade para sulfetos contendo outros grupos funcionais suscetíveis à oxidação; o método de oxidação permitiu que o complexo utilizado fosse reciclado e reutilizado.

Desta forma, o complexo aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI) foi selecionado para a realização da síntese do albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona a partir do sulfeto.

A reação de oxidação do ABZ foi realizada de acordo com procedimento descrito,<sup>94</sup> utilizando-se uma proporção de sulfeto/oxidante (1:1 mol/mol) em uma mistura de MeOH/ACN (1:5). A adição do  $\text{MoO}_5(\text{OPi})(\text{H}_2\text{O})$  foi realizada lentamente, com o auxílio de um adicionador de sólidos, com a reação à temperatura ambiente e sob constante agitação.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e quando não mais se observou o material de partida esta foi então cessada.

Para a extração foi adicionada ao meio reacional uma solução saturada de bicarbonato de sódio e posteriormente a extração foi realizada com diclorometano, em triplicata, sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador.

A purificação dos produtos obtidos foi realizada por cromatografia em coluna de bancada, utilizando-se como eluente uma mistura de diclorometano/acetona (4:6). A reação forneceu um rendimento de 87%, com a obtenção do sulfóxido como um sólido branco e a sulfona como um sólido amarelo.

A Figura 4.2 apresenta o esquema da síntese realizada com os dois produtos obtidos, o ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, empregando o complexo MoO<sub>5</sub>(OPi)(H<sub>2</sub>O)

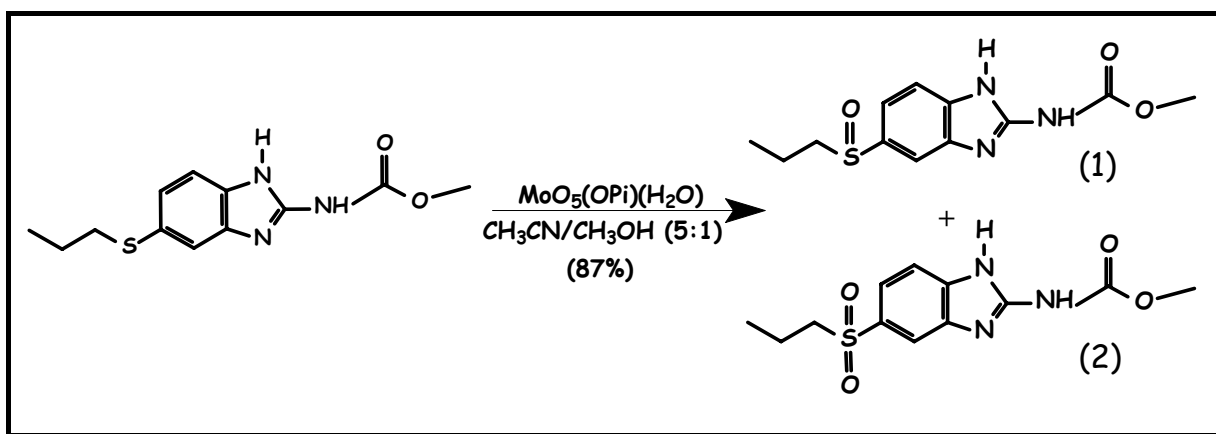


FIGURA 4.2: Esquema de síntese do (1): ABZ-SO e do (2): ABZ-SO<sub>2</sub>

Inicialmente, para a caracterização dos produtos obtidos, os compostos purificados foram submetidos à análise elementar, o que possibilitou a determinação dos teores de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre e também a avaliação da pureza dos compostos sintetizados. Os valores experimentais e teóricos do albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona estão apresentados na Tabela 4.1.

**TABELA 4.1:** Resultados da análise elementar para o albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona

Substância	Massa Molar (g/mol)	Valores Teóricos (%)	Valores Experimentais (%)
Albendazol- Sulfóxido (C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S)	281,33	C = 51,19 N = 14,93 H = 5,33 S = 11,37	C = 51,25 N = 14,65 H = 4,82 S = 12,29
Albendazol- Sulfona (C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S)	297,33	C = 48,47 N = 14,13 H = 5,08 S = 10,78	C = 48,24 N = 13,46 H = 5,41 S = 10,89

Analisando-se os valores experimentais obtidos, observa-se que os mesmos mostraram-se muito próximos dos valores teóricos calculados para cada composto, demonstrando o sucesso da síntese.

Análises por espectrometria de infravermelho foram também realizadas para a caracterização dos compostos sintetizados.

O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos funcionais dão origem a bandas espectrais que ocorrem em um mesmo intervalo de frequência, independente da estrutura da molécula. É justamente através da presença destas bandas características que é possível a obtenção e confirmação de certos grupos funcionais nas moléculas estudadas.<sup>96</sup>

Portanto, a espectroscopia de absorção no infravermelho é uma ferramenta fundamental na caracterização de compostos orgânicos.

A caracterização do albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona por infravermelho foi realizada apenas pela constatação das absorções

características dos grupos R-(SO)-R' e R-(SO<sub>2</sub>)-R' (Tabela 4.2), uma vez que para a síntese desses compostos partiu-se do correspondente sulfeto.

**TABELA 4.2:** Intervalo de frequências de absorção para grupamentos sulfóxido e sulfona.<sup>97</sup>

Grupos	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibração	Intensidade
R-(SO)-R'	1060 - 1015	S=O	intensa
R-(SO <sub>2</sub> )-R'	1180 - 1145	O=S=O (si)*	intensa
	1350 - 1270	O=S=O (as)**	

\*(si): simétrica e \*\*(as): assimétrica

Na Tabela 4.3 estão relacionados às frequências de absorção dos grupamentos S=O e O=S=O encontrados para os compostos sintetizados. Como se pode observar, estas frequências de absorção estão de acordo com os valores esperados para tais grupamentos (Tabela 4.2).

**TABELA 4.3:** Principais bandas no infravermelho encontradas para os compostos sintetizados

Substância	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Vibração	Intensidade
Albendazol-Sulfóxido	1026,7	S=O	intensa
Albendazol-Sulfona	1133,6 (si)*	O=S=O	intensa
	1256,0 (as)**		

\*(si): simétrica e \*\*(as): assimétrica



As Figuras 4.3 e 4.4 ilustram os espectros de infravermelho obtidos para o albendazol sulfóxido e sulfona, respectivamente. No primeiro, observa-se a deformação axial simétrica do grupamento S=O em  $1026,7\text{ cm}^{-1}$  e no segundo as deformações axial simétrica e assimétrica do grupo O=S=O em  $1133,6$  e  $1256,0\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

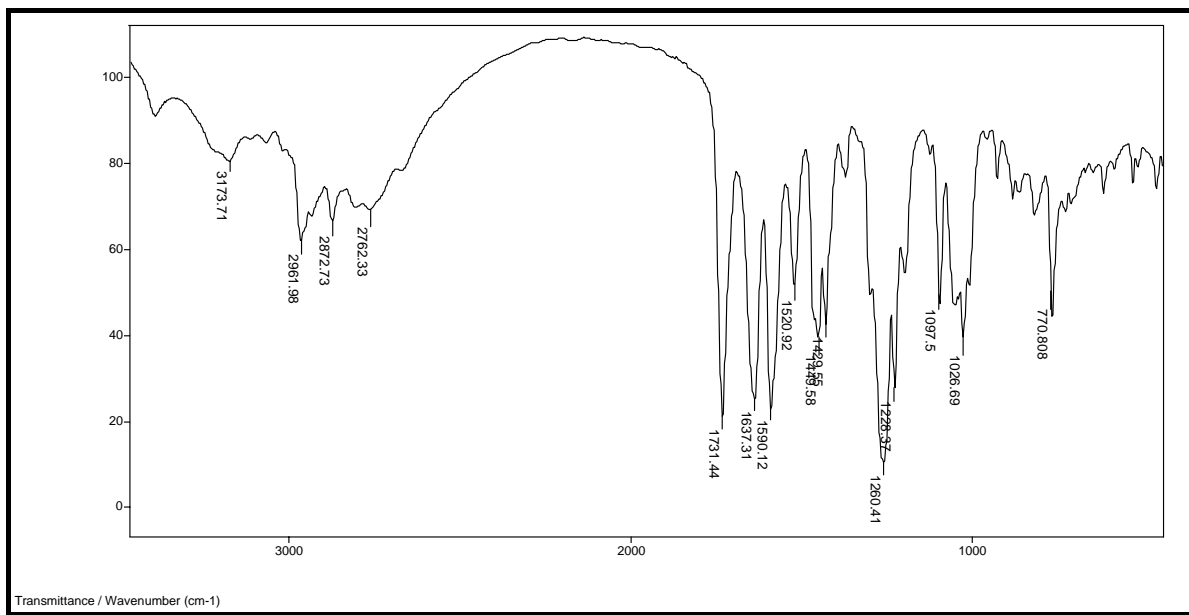


FIGURA 4.3: Espectro de absorção no infravermelho para o albendazol-sulfóxido.

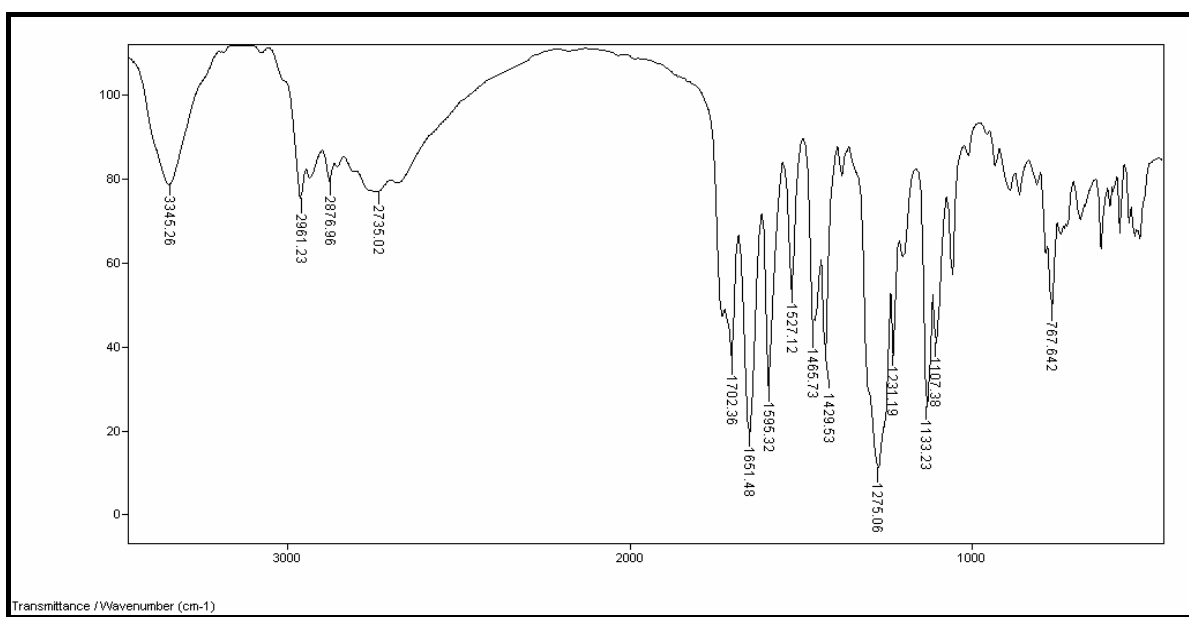


FIGURA 4.4: Espectro de absorção no do infravermelho para o albendazol-sulfona

Ainda para a caracterização do sulfóxido e sulfona sintetizados, fez-se uso de ressonância magnética nuclear de próton e carbono.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das ferramentas mais poderosas disponíveis para químicos e bioquímicos para elucidar estruturas de espécies químicas.<sup>98</sup>

Em todos os espectros de RMN -  $^1\text{H}$  e RMN -  $^{13}\text{C}$  realizados com o albendazol sulfóxido e sulfona foram utilizados como solvente o ácido trifluoracético deuterado, uma vez que estudos realizados por PODÁNYI e MORVAI<sup>99</sup> mostraram que este solvente propicia a protonação dos grupamentos -NH, evitando a interconversão da mistura tautomérica formada por estes compostos. Esta interconversão causa um alargamento dos sinais, o que muitas vezes pode resultar em erros na caracterização estrutural.

No espectro de RMN- $^1\text{H}$  do albendazol-sulfóxido (Figura 4.5 e 4.6) observa-se à presença de um tripleto em 1,19 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,4 Hz, integrando para 3 hidrogênios; um sextupeto em 1,86 ppm com J de 7,4 Hz integrando para 2 hidrogênios e um singleto em 4,10 ppm integrando para 3 hidrogênios. Há também a presença de dois duplos tripletos em 3,30 ppm integrando para 2 hidrogênios, com J de 14,2 Hz, para os hidrogênios geminais, de 6,8; 6,6 e 6,4 Hz para os hidrogênios vicinais. Estes dois duplos tripletos mostram a não equivalência dos hidrogênios vizinhos ao grupamento S=O, o qual é um centro quiral, sendo então hidrogênios diastereotópicos.

Na região de aromáticos (7,5-8,5 ppm) observa-se à presença de um duplo dubleto em 7,92 ppm que acopla com um dubleto em 8,01 ppm, com J de 8,5 Hz (acoplamento em orto) e que também acopla com dubleto em 8,32 ppm, com J 1,0 Hz (acoplamento em para), cada sinal sendo integrado para um hidrogênio.

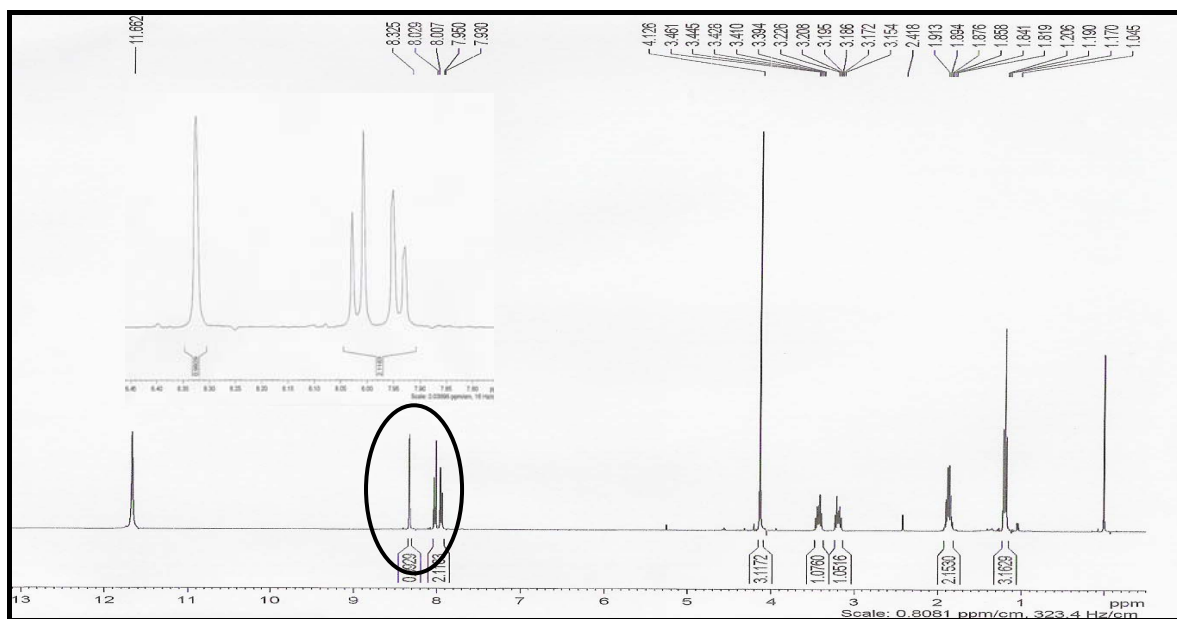


FIGURA 4.5: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para o albendazol-sulfóxido

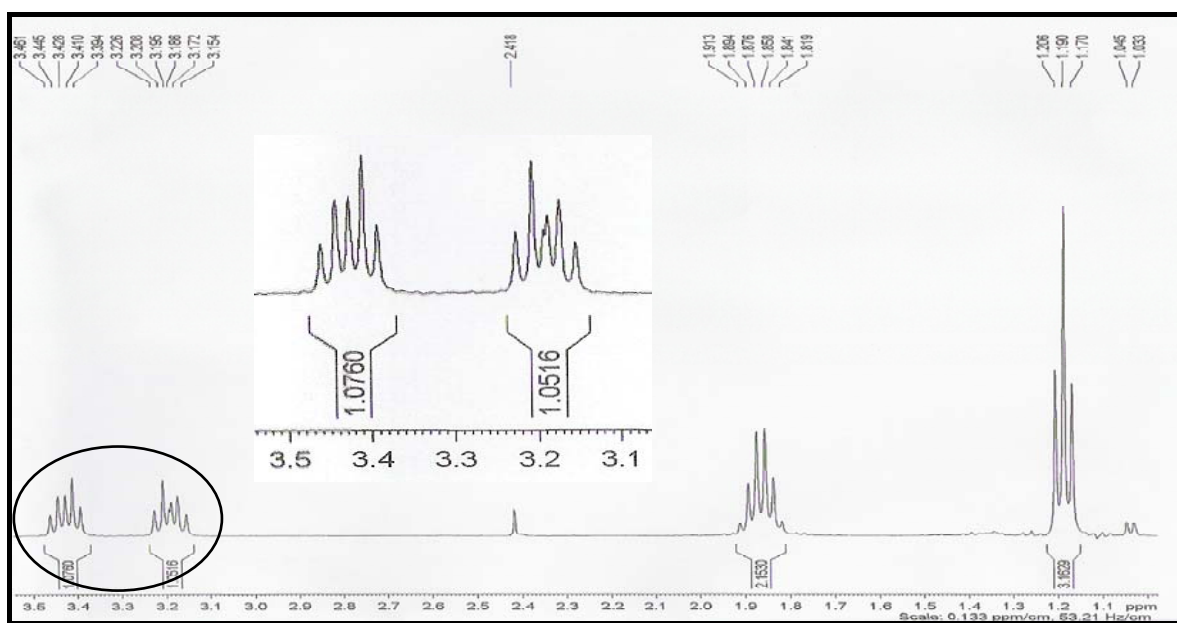


FIGURA 4.6: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para o albendazol-sulfóxido

Ainda para o albendazol-sulfóxido, os resultados obtidos para RMN-<sup>13</sup>C estão representados na Figura 4.7. As atribuições dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 4.8) estão todas acordo com os dados da literatura.<sup>99</sup>

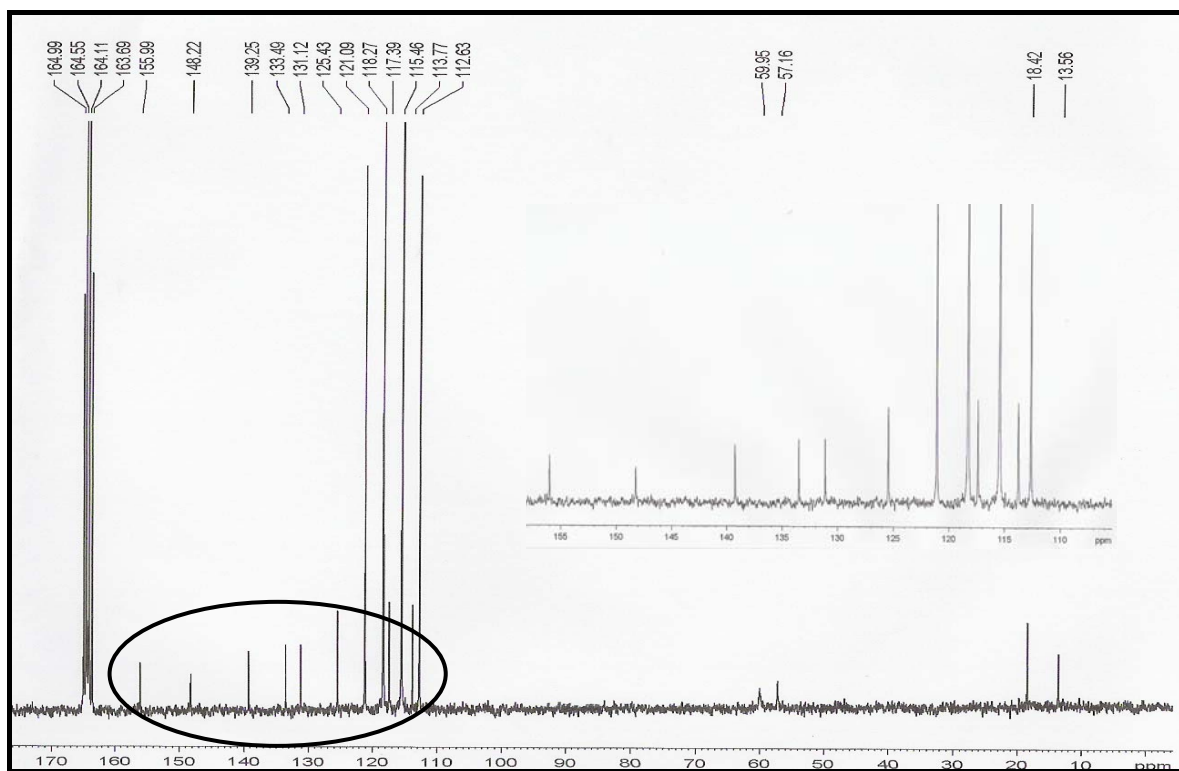


FIGURA 4.7: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  para o albendazol-sulfóxido

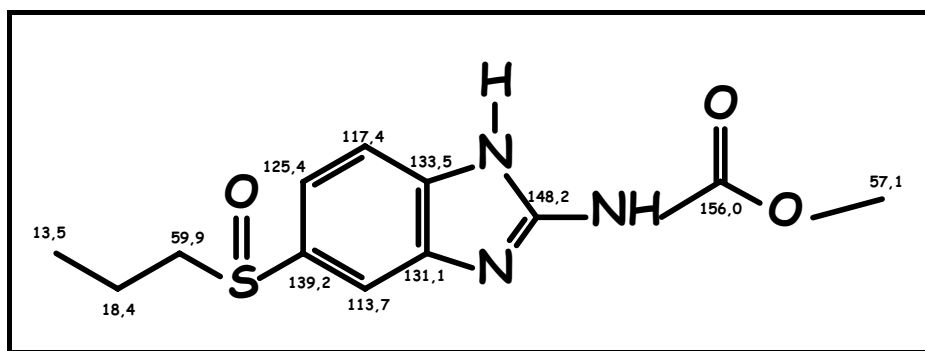


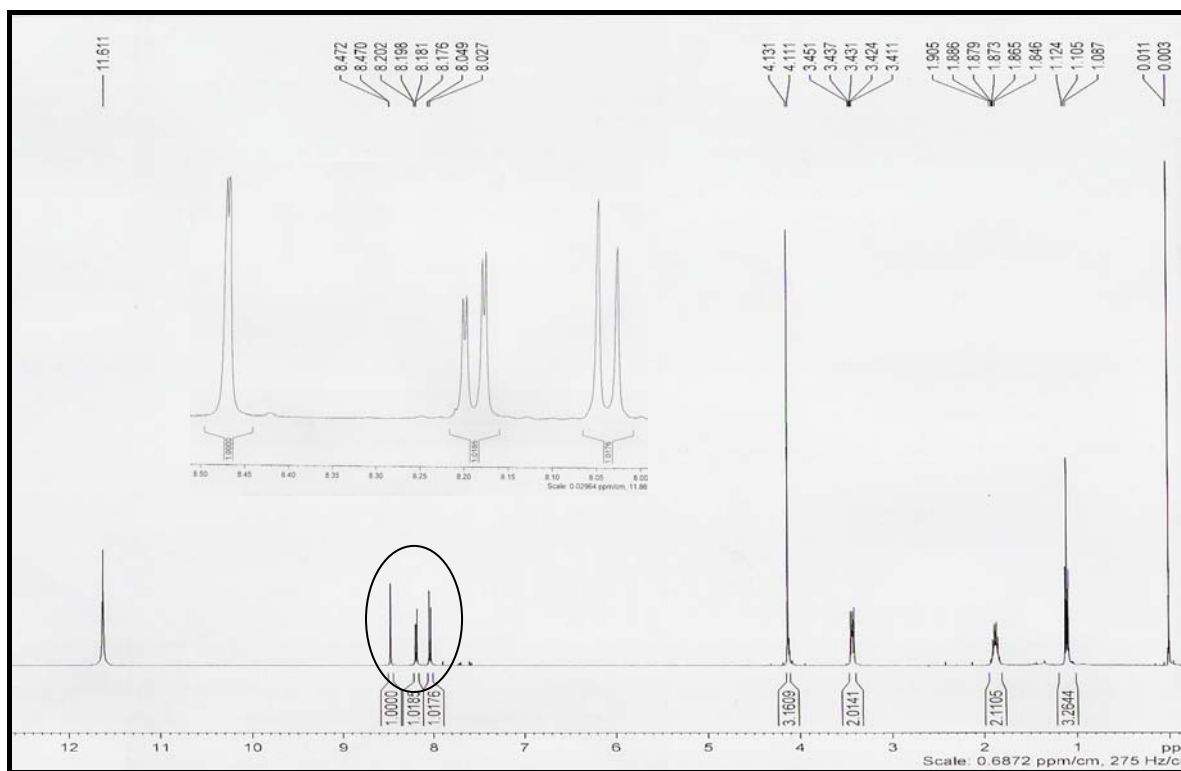
FIGURA 4.8: Atribuições dos sinais de RMN- $^{13}\text{C}$  para o albendazol-sulfóxido

O espectro de RMN- $^1\text{H}$  do albendazol-sulfona (Figura 4.9 e 4.10) apresenta um tripleto em 1,10 ppm com  $J$  de 7,4 Hz, integrando para 3 hidrogênios; um sextupeto em 1,87 ppm com  $J$  de 7,4 Hz, integrando para 2 hidrogênios; um tripleto deformado em 3,43 ppm com  $J$  de 8,0 Hz. Embora este último sinal esteja deformado, é possível visualizar a equivalência dos hidrogênios

vizinhos ao grupamento  $O=S=O$ , e também, um singlete em 4,13 ppm integrando para 3 hidrogênios.

Na região de aromáticos observa-se um duplo dubleto em 8,19 ppm, que acopla com um dubleto em 8,03 ppm com  $J$  de 8,7 Hz (acoplamento em orto) e que também acopla com dubleto em 8,47 ppm com  $J$  1,6 Hz (acoplamento em para), cada sinal está integrando para um hidrogênio.

Para o albendazol-sulfona, os resultados referentes a RMN- $^{13}C$  estão representados na Figura 4.11. As atribuições dos sinais de RMN- $^{13}C$  estão apresentados na Figura 4.12 e também estão de acordo com os dados da literatura.<sup>99</sup>



**FIGURA 4.9:** Espectro de RMN- $^1H$  para o albendazol-sulfona

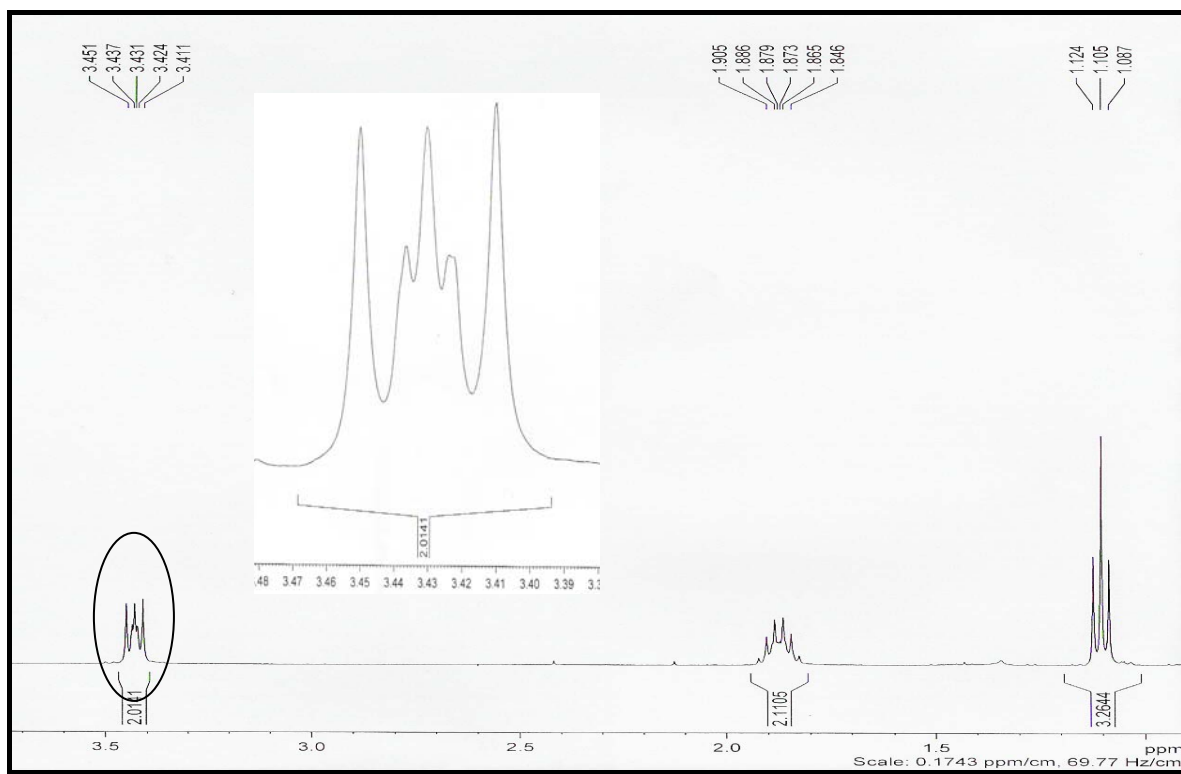


FIGURA 4.10: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para o albendazol-sulfona.

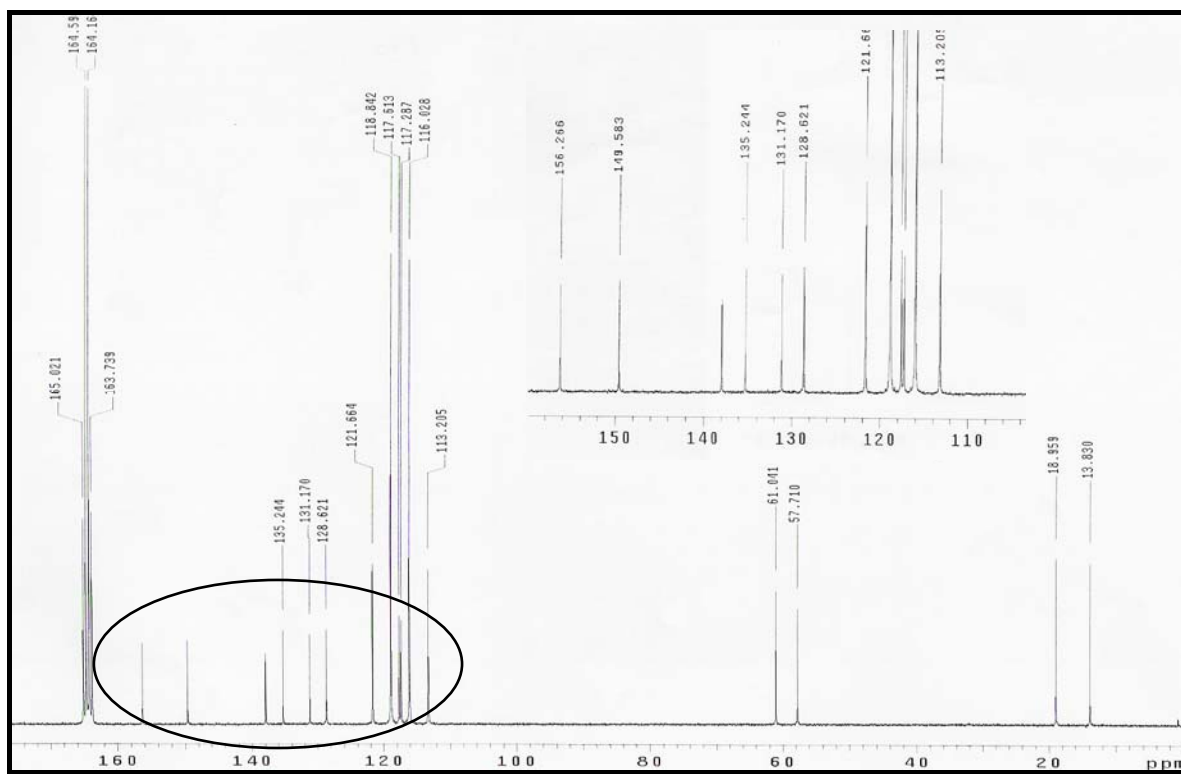


FIGURA 4.11: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C para o albendazol-sulfona

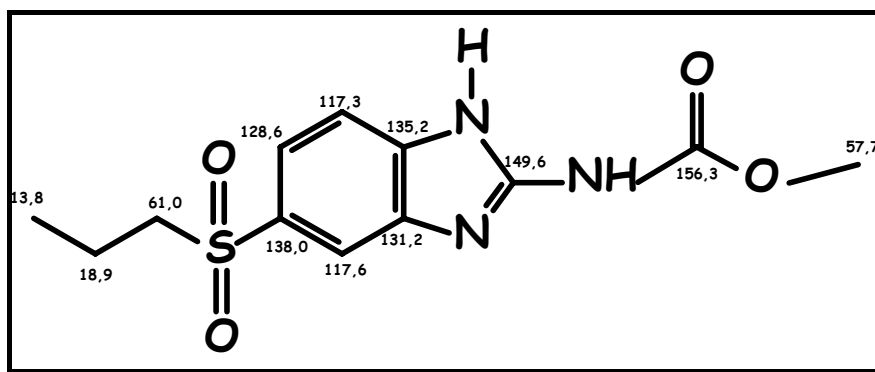


FIGURA 4.12: Atribuições dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C para o albendazol-sulfona.

Portanto, com os dados obtidos de análises elementares, infravermelhos e RMN de próton e carbono, foi possível caracterizar ambos os compostos sintetizados, albendazol-sulfóxido e albendazol-sulfona, demonstrando, então, o sucesso da síntese.

#### 4.2 - COLUNAS RAM-BSA

A análise e quantificação de fármacos em diversos tipos de fluidos biológicos é muito importante para a compreensão do comportamento farmacocinético e farmacodinâmico desses compostos. Dentro deste contexto, uma das maiores dificuldades no desenvolvimento dos métodos de análise reside no desafio de obter uma amostra em condições adequadas de ser analisada, o que significa livre de compostos interferentes e endógenos, os quais além de prejudicarem as análises, também podem danificar as colunas cromatográficas.

Assim, uma das etapas mais importantes na análise de fármacos presentes em fluidos biológicos é o pré-tratamento das amostras.

Os métodos mais rotineiramente utilizados para o tratamento de amostras biológicas incluem extração em fase sólida, extração líquido-líquido e precipitação de proteínas. No entanto, o gasto com solventes orgânicos tóxicos, a extensiva manipulação das amostras, perdas do analito, possíveis contaminações e

principalmente o tempo gasto no preparo das amostras biológicas, despertou o interesse pela automação dos sistemas cromatográficos, assim como por injeção direta de biofluidos nas colunas cromatográficas.

Assim, o aprimoramento da técnica de injeção direta levou ao desenvolvimento de colunas extratoras com superfícies discriminantes, sendo estas designadas colunas de acesso restrito (RAM).

As fases de acesso restrito são suportes cromatográficos desenvolvidos especialmente para a análise de compostos de baixo peso molecular em matrizes complexas. Esses materiais permitem a injeção direta de amostras não tratadas de fluidos biológicos sem o comprometimento do sistema cromatográfico.

As colunas RAM apresentam uma ampla gama de aplicação dentro das análises de fármacos e metabólitos, como mostram SOUVERIAN *et al.*<sup>55</sup>, MULLETT *et al.*<sup>59</sup> e CASSIANO *et al.*<sup>100</sup> em recentes revisões, as quais relatam métodos de análises para uma série de compostos utilizando as mais variadas matrizes biológicas, dentre elas plasma, soro, urina, leite, microssomas, cultura de células, saliva, bile, tecidos e secreções.

As colunas de acesso restrito recobertas com proteínas, em especial aquelas recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA), mostraram excelentes resultados para trabalhos realizados no grupo, na análise de fármacos em plasma humano, com acoplamento das colunas RAM-BSA tanto com colunas analíticas aquirais<sup>101</sup> quanto a colunas analíticas quirais.<sup>102-104</sup>

A determinação de amoxicilina foi realizada através do acoplamento aquiral-aquiral, onde uma coluna C<sub>18</sub>-BSA foi acoplada a uma analítica C<sub>18</sub>-Hypersil.<sup>101</sup> As análises dos enantiômeros do metirapol e seu principal metabólito, a metirapona, e dos enantiômeros do pantoprazol, foram realizadas por meio de um acoplamento aquiral-quiral utilizando uma coluna C<sub>8</sub>-BSA acoplada a uma coluna quiral de polissacarídeo tris(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose.<sup>102,103</sup>



A determinação dos enantiômeros do omeprazol foi realizada através do acoplamento da coluna  $C_8$ -BSA a coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.<sup>104</sup> Todos esses trabalhos foram realizados em plasma humano e excelentes resultados para a eficiência na exclusão protéica e extração dos fármacos e metabólitos de interesse foram alcançados.

PEREIRA e CASS<sup>105</sup> e OLIVEIRA *et al.*<sup>106,107</sup> também mostraram a eficiência das colunas RAM-BSA para análise de fármacos em leite. Através do acoplamento aquiral-aquiral foram realizadas a determinação do sulfametoxazol e trimetoprima, cefalexina e cefoperazone, onde os métodos utilizaram colunas extratoras do tipo  $C_8$ -BSA e fenil-BSA.

Mais recentemente, DE PAULA<sup>108</sup> desenvolveu um método para análise simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em ovos de galinhas com o emprego de uma coluna  $C_{18}$ -BSA, aumentando, assim, a variabilidade de matrizes analisadas com essas colunas extratoras.

No presente trabalho foram selecionadas as colunas RAM-BSA, devido à fácil disponibilidade comercial da albumina sérica bovina, seu baixo custo e principalmente, às suas propriedades físico-químicas, às quais permitem a utilização dessas colunas em várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma vantagem quando se trabalha com injeção direta de amostras biológicas.<sup>52</sup>

As fases hidrofóbicas selecionadas para o presente trabalho foram  $C_8$  e  $C_{18}$ , uma vez que estas têm sido eficientemente empregadas em diversos trabalhos<sup>101-106,108</sup> (Figura 4.13).

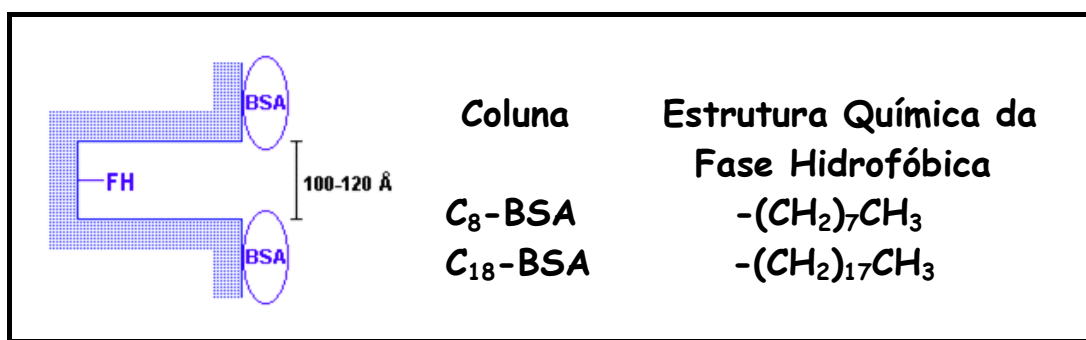


FIGURA 4.13: Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA)

#### 4.2.1 - Preparo das colunas RAM-BSA

As colunas RAM do tipo hidrofóbica imobilizada com albumina sérica bovina (RAM-BSA) foram preparadas em três etapas de acordo com protocolo descrito por MENEZES e FÉLIX<sup>73</sup> (Figura 4.14).

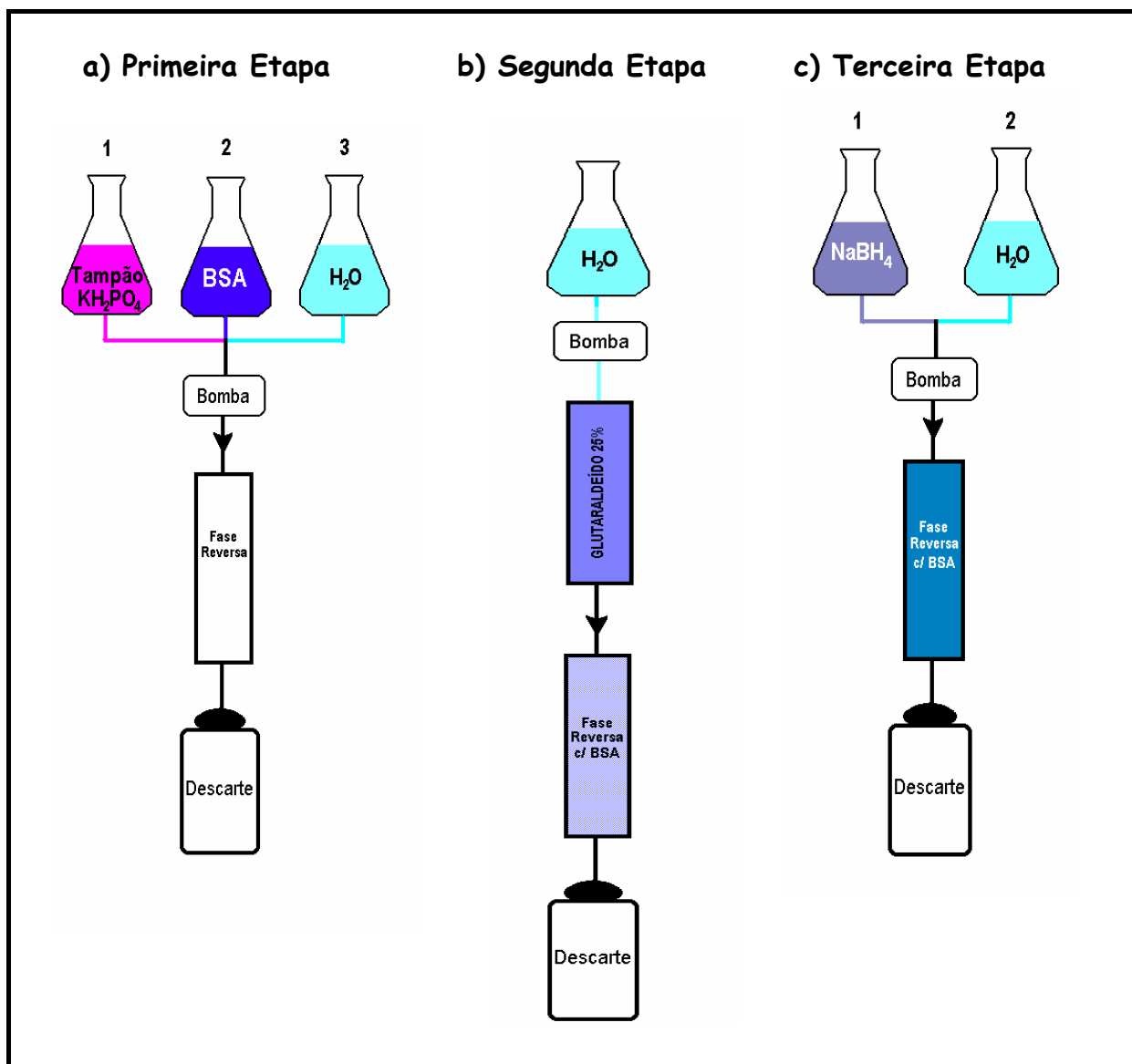


FIGURA 4.14: Etapas de preparação das colunas RAM-BSA.<sup>63</sup>

Inicialmente a coluna foi condicionada com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M; pH 6,0), e então albumina sérica bovina (BSA) foi imobilizada *in situ* na fase hidrofóbica através de cromatografia frontal.

Após a imobilização da BSA, esta foi reagida com uma solução de glutaraldeído (25% v/v). A reação dos grupos amins livres da albumina com o glutaraldeído resultaram na formação de iminas, e conseqüentemente, geraram ligações intercruzadas entre albumina sérica bovina e o glutaraldeído.

Em seguida, para se evitar uma possível hidrólise da dupla ligação da base de Schiff e evitar que os grupos aldeídos residuais reajam posteriormente com compostos analisados na coluna, esses grupos foram reduzidos com uma solução de boroidreto de sódio. Após duas horas, as colunas foram eluídas com água durante 1 hora e então guardadas em geladeira até o momento do uso. A Figura 4.15 ilustra as reações envolvidas no preparo das colunas RAM-BSA.

A reação de intercruzamento da proteína com glutaraldeído, seguida da reação de redução com boroidreto de sódio, são necessárias uma vez que conferem às colunas maior estabilidade e durabilidade, isto porque o intercruzamento evita a perda de proteína, o qual pode acontecer quando esta se encontra apenas imobilizada na superfície do suporte.

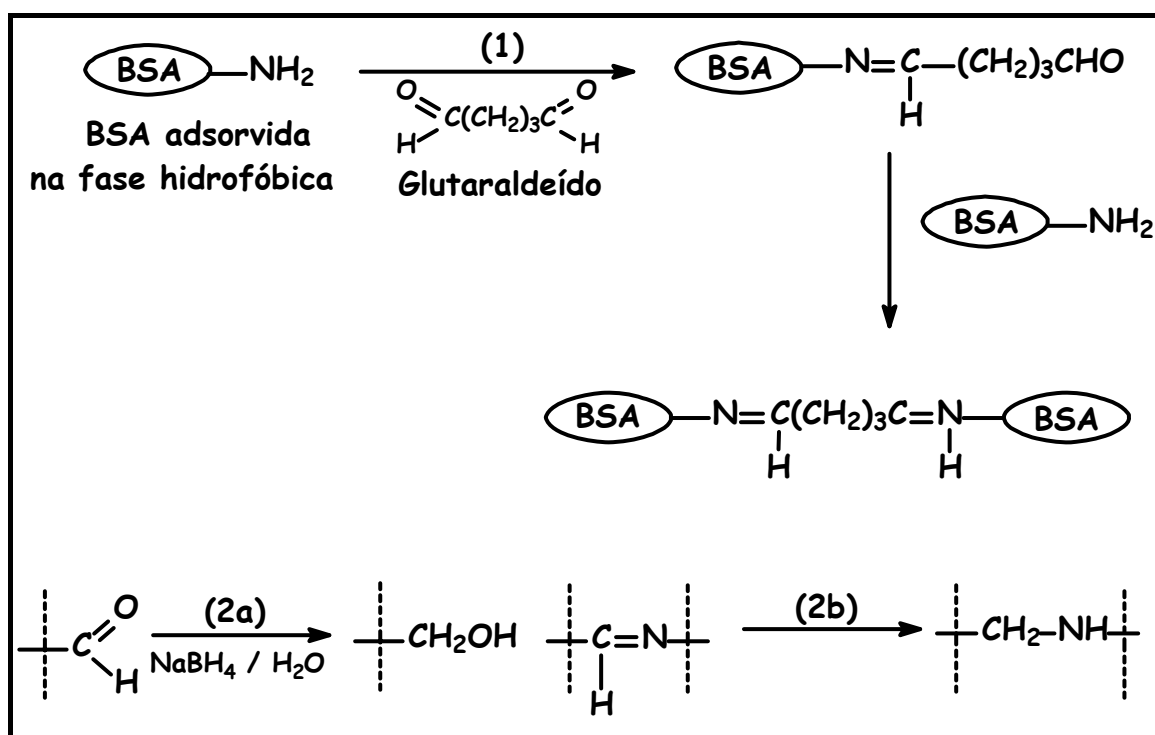


FIGURA 4.15: Seqüência de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de Schiff entre BSA e glutaraldeído; (2a) e (2b) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais.<sup>63</sup>

#### 4.2.2 - Exclusão das proteínas do plasma bovino pelas colunas

##### RAM-BSA

Baseado em trabalhos realizados no grupo para plasma humano,<sup>101-104,109</sup> leite bovino<sup>105-107</sup> e ovos de galinha,<sup>108</sup> que investigaram a eficiência de exclusão protéica pelas colunas RAM-BSA, foi escolhido o método de BRADFORD<sup>88</sup> para avaliar a performance de exclusão de proteínas do plasma bovino pelas colunas C<sub>3</sub>-BSA e C<sub>18</sub>-BSA preparadas no presente trabalho.

O método de BRADFORD<sup>88</sup> é uma técnica utilizada para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Figura 4.16). Este método baseia-se nas interações de London e hidrofóbicas entre o corante CBB e as proteínas de alto peso molecular, provocando um deslocamento na absorção de 465 nm para 595 nm.

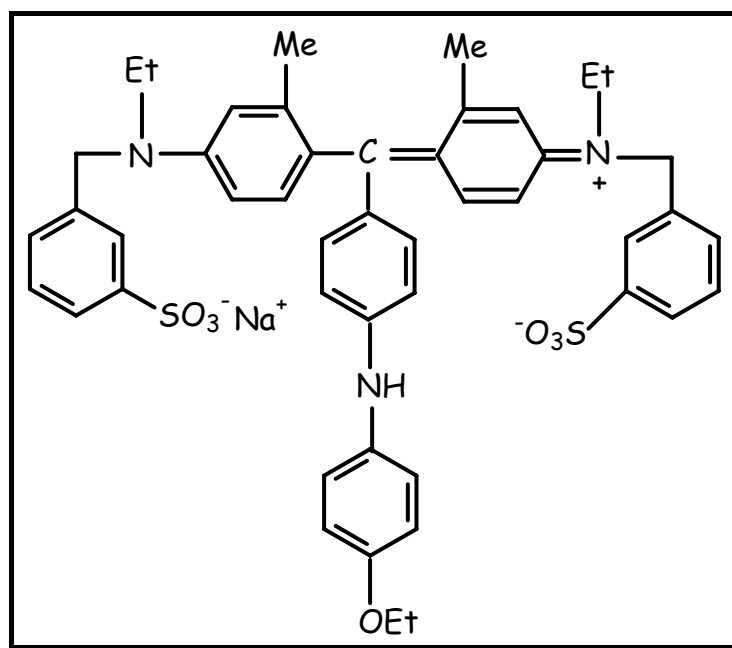


FIGURA 4.16: Estrutura do Corante *Coomassie Brilliant Blue* (CBB).

A eficiência do poder de exclusão das proteínas do plasma bovino pelas colunas RAM-BSA preparadas foram então avaliadas. Para isso a recuperação protéica foi calculada através das absorbâncias (595 nm) do

complexo corante-proteína das soluções referência de plasma bovino comparadas com as absorvâncias das frações do plasma bovino eluído das colunas RAM-BSA. As soluções referência de plasma bovino consistiram de alíquotas de plasma bovino (50, 100 e 200 $\mu$ L) diluídas em 2,0 mL de água. Essas soluções referência forneceram a quantidade total de proteínas presentes no plasma (100%), tendo em vista que foram obtidas sem passar pelas colunas extratoras. O plasma bovino foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos antes do preparo de qualquer solução ou injeção.

A eficiência da exclusão protéica foi avaliada injetando-se plasma bovino, após ter sido centrifugado, nas colunas extratoras e coletando duas frações de 2,0 mL do eluato, sendo a primeira no tempo de 0-2 minutos e a segunda no tempo de 2-4 minutos. Cada uma das frações coletadas foi analisada através da complexação com o reagente CBB, e foram monitoradas espectrofotometricamente. A Figura 4.17 ilustra o procedimento realizado.

Na Figura 4.18, os espectros de ultravioleta ilustram a sensibilidade do método, para diferentes volumes de injeção do plasma bovino, e conseqüentemente, diferentes concentrações de proteínas, enquanto a Figura 4.19 ilustra os espectros de absorvância de duas frações de 200  $\mu$ L, uma coletada a partir da coluna RAM e a outra sendo a amostra de referência. O espectro do corante é mostrado em ambas as figuras.

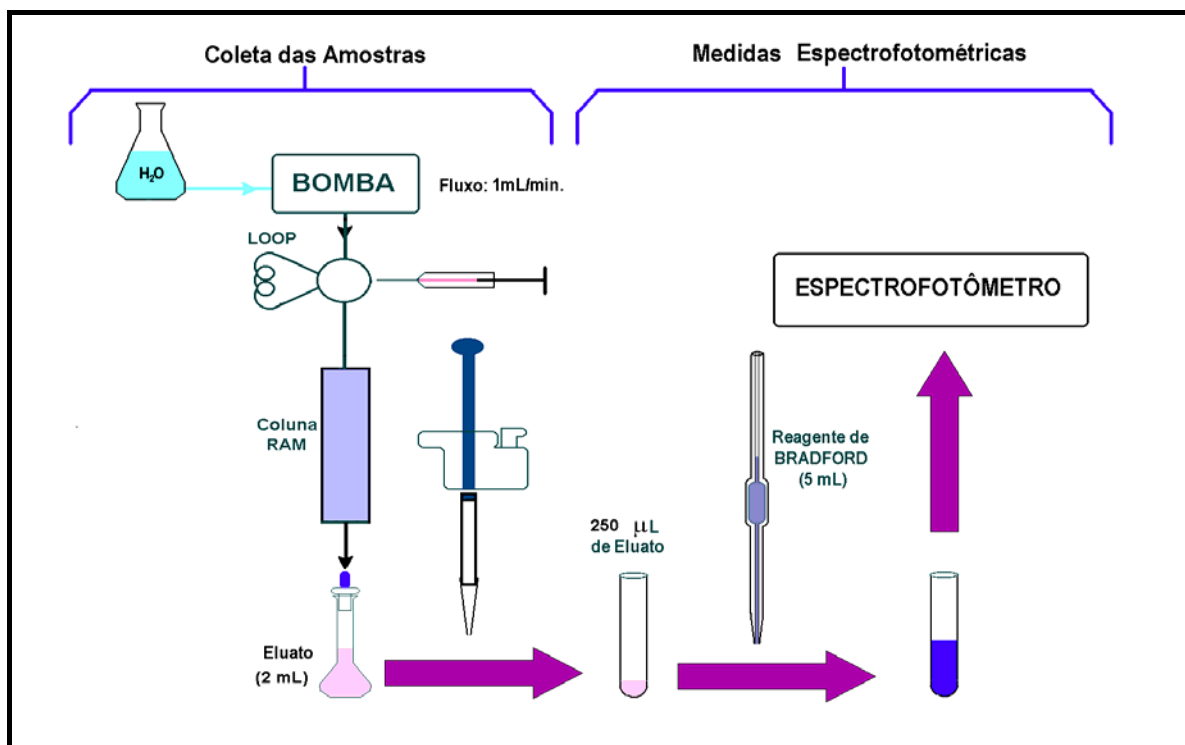


FIGURA 4.17: Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do plasma bovino pelas colunas RAM-BSA.<sup>63</sup>

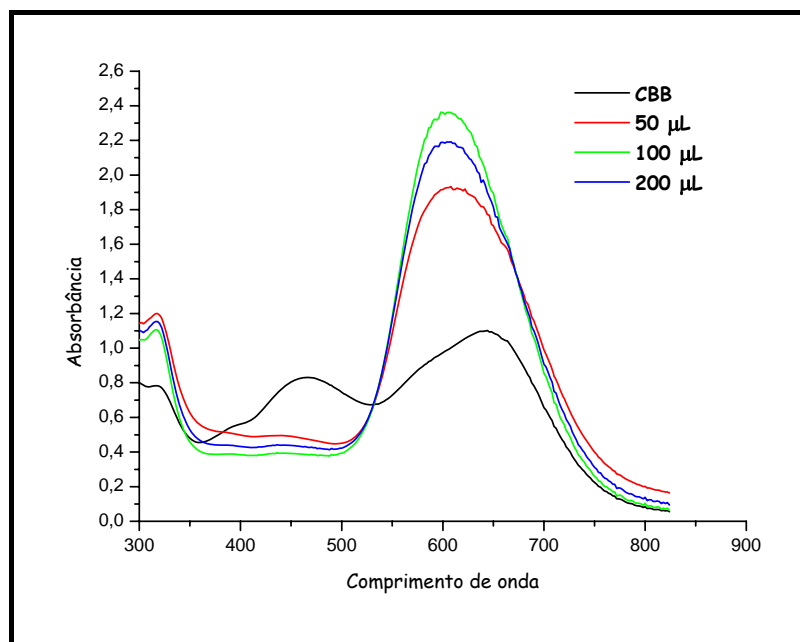
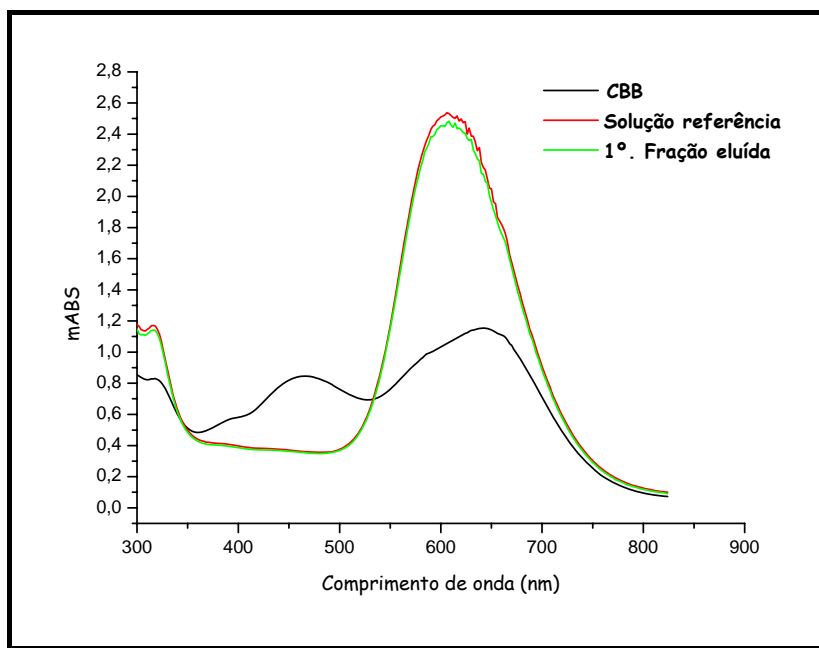


FIGURA 4.18: Espectros obtidos da reação do corante CBB com proteínas do plasma bovino, eluídas da coluna extratora C<sub>8</sub>-BSA (5,0 × 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10 µm). Espectros do Corante CBB com água e CBB complexado com proteínas de 50 µL; 100 µL e 200 µL de plasma bovino.

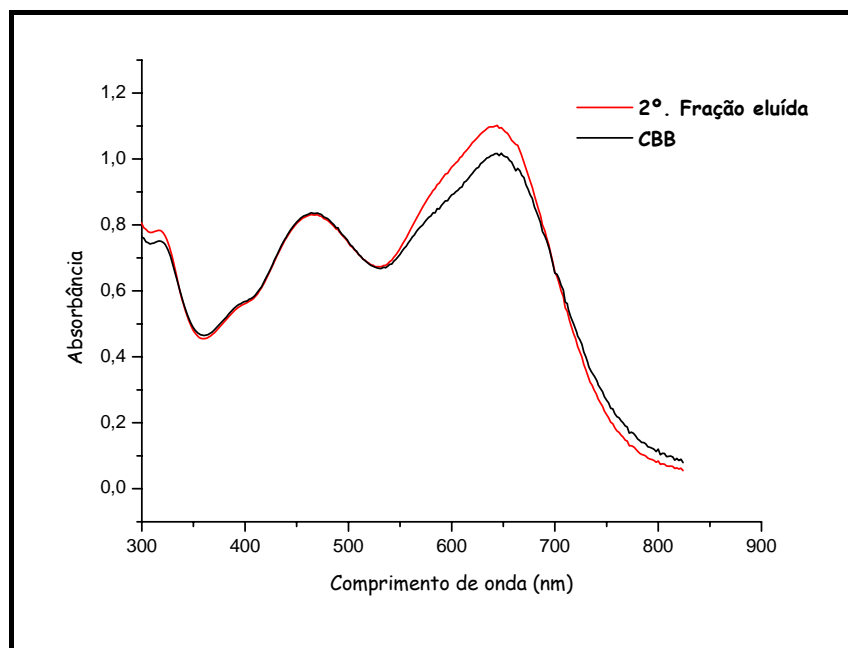


**FIGURA 4.19:** Espectros obtidos da amostra referência e da fração coletada da coluna extratora  $C_8$ -BSA ( $5 \times 0,46$  cm d.i.) ( $100 \text{ \AA}$ ,  $10 \mu\text{m}$ ). Espectros do Corante CBB com água; CBB complexado com proteínas de  $200 \mu\text{L}$  da solução referência e CBB complexado com proteínas de  $200 \mu\text{L}$  da 1ª fração eluída da coluna (0-2 min).

Os espectros do corante apresentados em ambas as figuras anteriores, permite visualizar que quando este se encontra na presença de proteínas do plasma bovino as bandas 470 e 650 nm do corante desaparecem, e há um aumento da absorvância na região de 595 nm.

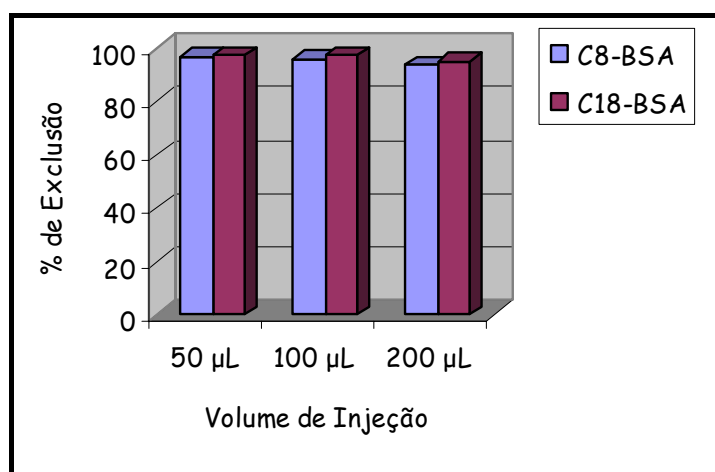
Outro aspecto importante que vale a pena ressaltar é que o espectro correspondente à amostra da segunda fração eluída do plasma bovino (2-4 min) complexada com o corante é muito similar ao espectro do próprio corante (Figura 4.20). Isto sugere, qualitativamente, a ausência de proteínas nesta fração que foi coletada após 2 min de eluição e pode ser confirmada pelo cálculo das percentagens de exclusão das proteínas pelas colunas extratoras (Tabela 4.4).





**FIGURA 4.20:** Comparação entre os espectros do corante-proteína da segunda fração de plasma eluído pela coluna extratora  $C_8$ -BSA (100 Å, 10  $\mu\text{m}$ ) (2-4 min) e do corante CBB com água. Volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$

A Figura 4.21 mostra um gráfico comparativo entre as colunas extratoras  $C_8$  e  $C_{18}$ -BSA, quanto a porcentagem de exclusão das proteínas do plasma bovino.



**FIGURA 4.21:** Percentagens de proteínas do plasma bovino excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída de (0-2 min).

**TABELA 4.4:** Percentagens de proteínas do plasma bovino excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída (0-2 min) e respectivos coeficientes de variação das injeções.

Coluna	Volume de Plasma Bovino Injetado na Coluna					
	50 $\mu$ L		100 $\mu$ L		200 $\mu$ L	
	Média	CV	Média	CV	Média	CV
C <sub>8</sub> -BSA	96,7	4,46	96,0	2,17	93,8	1,89
C <sub>18</sub> -BSA	97,2	2,93	97,2	2,02	95,0	2,58

Os resultados percentuais obtidos para as duas colunas RAM-BSA (Tabela 4.4), demonstraram que estas fases têm excelente poder de exclusão para as proteínas do plasma bovino, utilizando somente água como fase móvel. A média da exclusão, nos dois primeiros minutos de análise foi de 96 %.

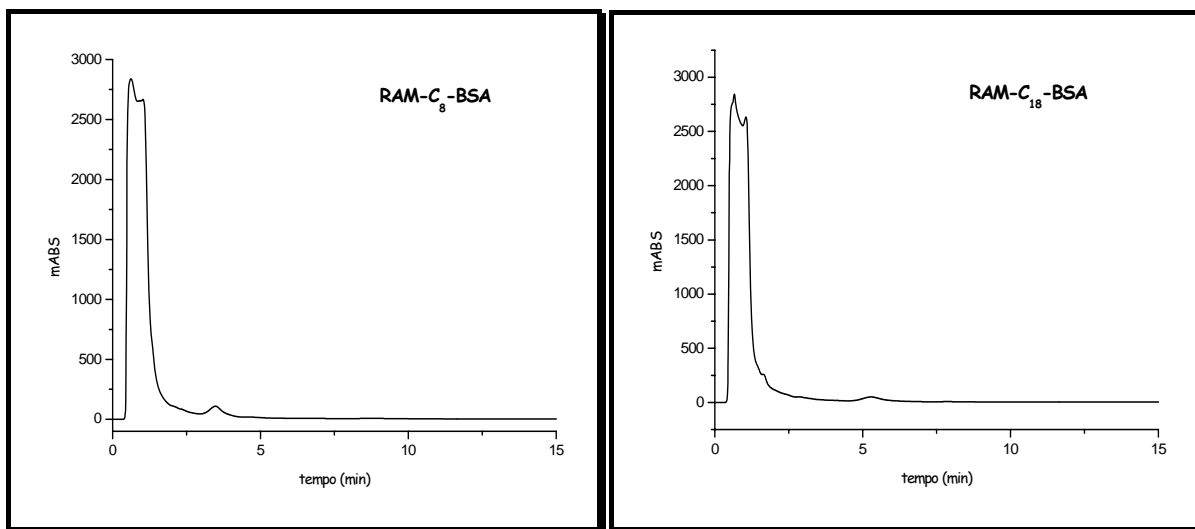
No entanto, a segunda fração coletada não indicou a presença de proteínas, inferindo que 4% (em média) das proteínas podem ter ficado adsorvidas na fase estacionária e/ou nos frits das colunas cromatográficas, conforme já reportado por YU *et al.*<sup>110</sup>.

De acordo YU *et al.*<sup>110</sup> após um determinado número de injeções de fluidos biológicos, há a necessidade da limpeza dos frits ou até mesmo a sua substituição, para eliminar problemas de elevação da pressão do sistema cromatográfico, devido à adsorção de gorduras e proteínas nos mesmos.

Em nosso grupo de pesquisa, foram observados problemas como o mencionado acima, principalmente, na análise de antibióticos em leite bovino<sup>111</sup> e em ovos de galinha<sup>108</sup>, com colunas RAM-BSA.

A Figura 4.22 mostra os perfis cromatográficos das exclusões protéicas do plasma bovino usando as duas colunas RAM-BSA preparadas e água

como fase móvel, com vazão de 1,0 mL/min, medidos a 280 nm por ser o máximo de absorvência das proteínas plasmáticas.



**FIGURA 4.22:** Cromatogramas dos perfis de eluição do plasma bovino nas colunas RAM-BSA. Fase Móvel: água; vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda=280$  nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L.

A exclusão protéica obtida para as fases imobilizadas com BSA, mostra que esta é hidrofílica o suficiente para excluir as proteínas nas condições cromatográficas utilizadas. Isso porque a BSA encontra-se negativamente carregada, por possuir um ponto isoelétrico de 4,9; e através de interações repulsivas, exclui as proteínas do plasma bovino. Aqui cabe ressaltar que no plasma bovino é encontrada a albumina sérica bovina (BSA) em grandes porcentagens, portanto negativamente carregada em valores de pH acima do seu ponto isoelétrico.

Pode-se afirmar que as colunas RAM-BSA são extremamente satisfatórias no que diz respeito a sua utilização como colunas de exclusão para o desenvolvimento de métodos analíticos em CLAE por injeção direta de amostras biológicas.

### 4.3 - FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DE POLISSACARÍDEOS

A utilização de fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos tem sido vastamente investigadas, mostrando grande versatilidade e excelente poder de discriminação quiral para uma vasta classe de compostos.<sup>36,39,43</sup>

Os polissacarídeos mais utilizados são amilose e celulose (Figura 4.23). Estes diferem entre si somente na sua estrutura química, na posição 1,4- $\beta$ -glicosídica, no entanto grandes diferenças na enantiosseletividade podem ser observadas com esses polissacarídeos.<sup>38</sup>

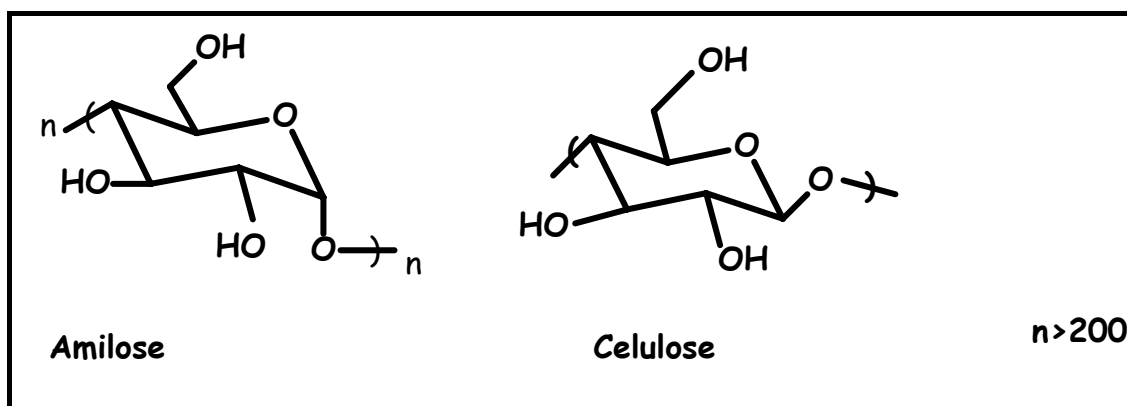


FIGURA 4.23: Celulose e amilose

A 3-aminopropilsílica (APS) tem sido aceita como o suporte ideal para estas fases. Este suporte decresce as interações não estereosseletivas e aumenta a estabilidade da cobertura, por fornecer condições para a formação de pontes de hidrogênio. Estudos realizados por GRIEB *et al.*<sup>113</sup> demonstraram que em muitos casos, o uso de sílica não derivada e octadecil sílica oferece vantagens quando comparado com APS. Para a resolução de sulfóxidos, entretanto, a APS mostrou melhores resultados quando comparada à sílica não derivada. Isto se

deve, provavelmente, a interações não estereosseletivas dos sulfóxidos com os grupos silanóis livre.<sup>114</sup>

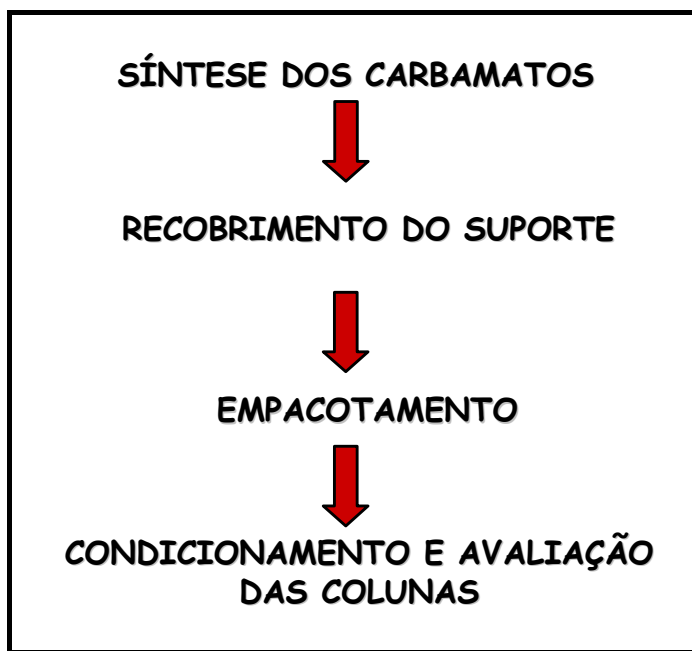
CASS e BATIGALHIA<sup>115</sup> reportaram a enantiorresolução de uma série de vinte sulfóxidos quirais, os quais foram avaliados sistematicamente em eluição multimodal, utilizando fases estacionárias quirais de polissacarídeos. Dos 20 sulfóxidos analisados todos foram enantiorresolvidos em uma ou outra fase estacionária quiral utilizada.

MONTANARI *et al.*<sup>116</sup>, CLANKVETADZE *et al.*<sup>117</sup> e MATLIN *et al.*<sup>118</sup> também reportaram estudos de enantiosseletividade para sulfóxidos quirais utilizando colunas de polissacarídeos. Todos os trabalhos demonstram excelentes resultados, onde a grande maioria dos sulfóxidos estudados foram enantiorresolvidos nestas fases.

Diante dos resultados reportados para essas fases quirais, portanto, para este trabalho foram selecionadas as fases estacionárias quirais dos polissacarídeos celulose e amilose para a avaliação quanto ao poder de discriminação quiral frente ao albendazol-sulfóxido.

#### **4.3.1 - Síntese, caracterização e avaliação da fase tris(arilcarbamatos) de celulose e amilose**

O preparo das fases estacionárias quirais envolveu a síntese dos carbamatos, derivatização e recobrimento do suporte, o empacotamento, condicionamento e posterior avaliação das colunas preparadas (Figura 4.24).



**FIGURA 4.24:** Esquema do método para a preparação das colunas quirais<sup>38</sup>

Todas as fases estacionárias foram preparadas, em nosso grupo de pesquisa, segundo a literatura.<sup>119</sup>

As fases trisartilcarbamatos de celulose e amilose foram preparadas pela reação da amilose ou celulose com isocianato de arila correspondente. Na reação, ocorre um ataque nucleofílico dos grupos hidroxila do polissacarídeo a carbonila do isocianato, levando às substituições nos grupos hidroxila e a formação dos carbamatos desejados (Figura 4.25)

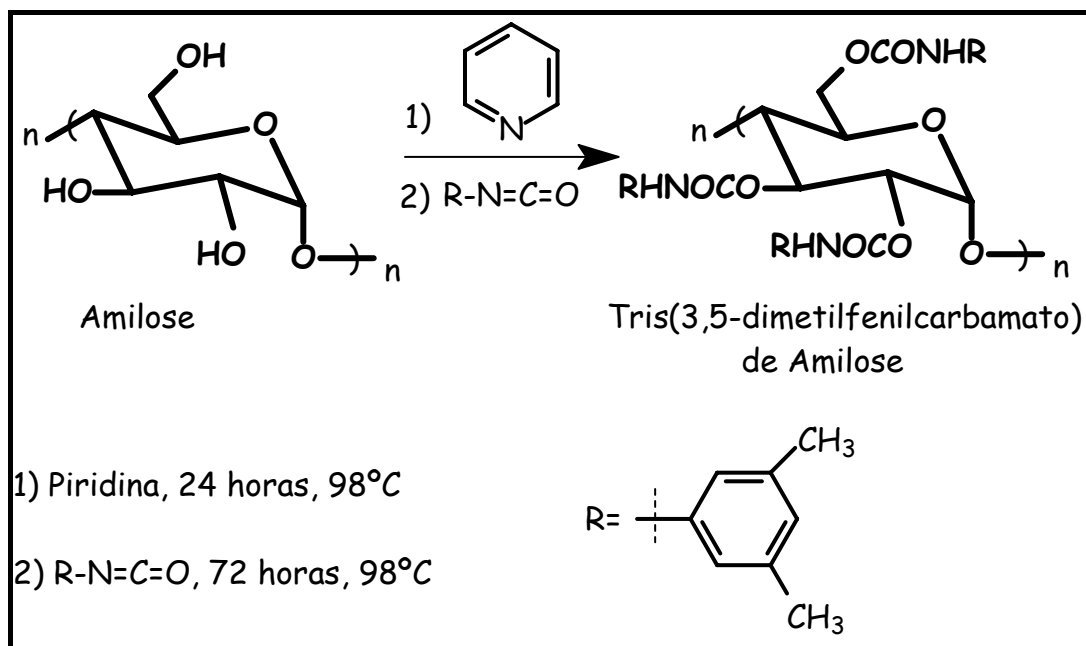


FIGURA 4.25: Esquema da síntese do tris(arilcarbamato) de amilose.

Nessas reações utilizam-se condições anidras devido à alta reatividade do isocianato, o qual reage rapidamente com água levando à formação de ácido carbâmico, o qual perde dióxido de carbono levando a formação de uma amina primária, que por sua vez pode reagir com isocianato, resultando em uréia (Figura 4.26).

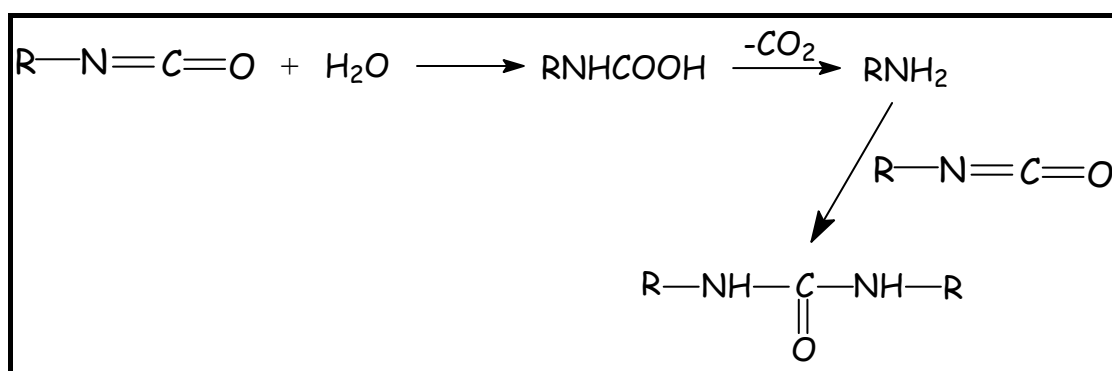
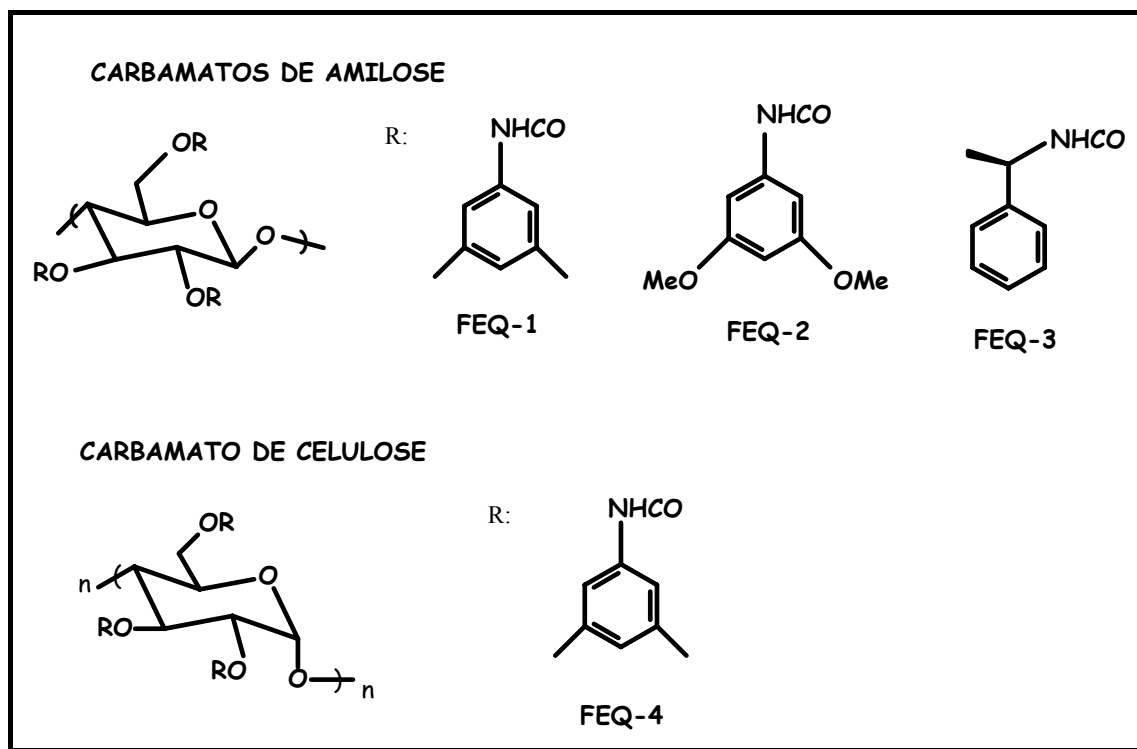


FIGURA 4.26: Esquema da reação de isocianato com água

Os carbamatos sintetizados (Figura 4.27) foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e análise elemental.



**FIGURA 4.27:** Carbamatos preparados para a cobertura na sílica

O espectro no IV (Figura 4.28) da amilose não derivada mostra uma intensa e característica absorção em  $3431,1 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde aos estiramentos dos grupos hidroxila (-OH).

Após a reação da amilose ou celulose com o isocianato, pode-se observar que os espectros de infravermelho (representado na Figura 4.29 para a FEQ-1), mostram absorções próximas a  $1730 \text{ cm}^{-1}$ , de intensidade forte, características de deformação axial das ligações C=O dos grupos carbamatos, em  $1220 \text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C-N e também em  $3330 \text{ cm}^{-1}$  referente a deformações axiais do grupo N-H.



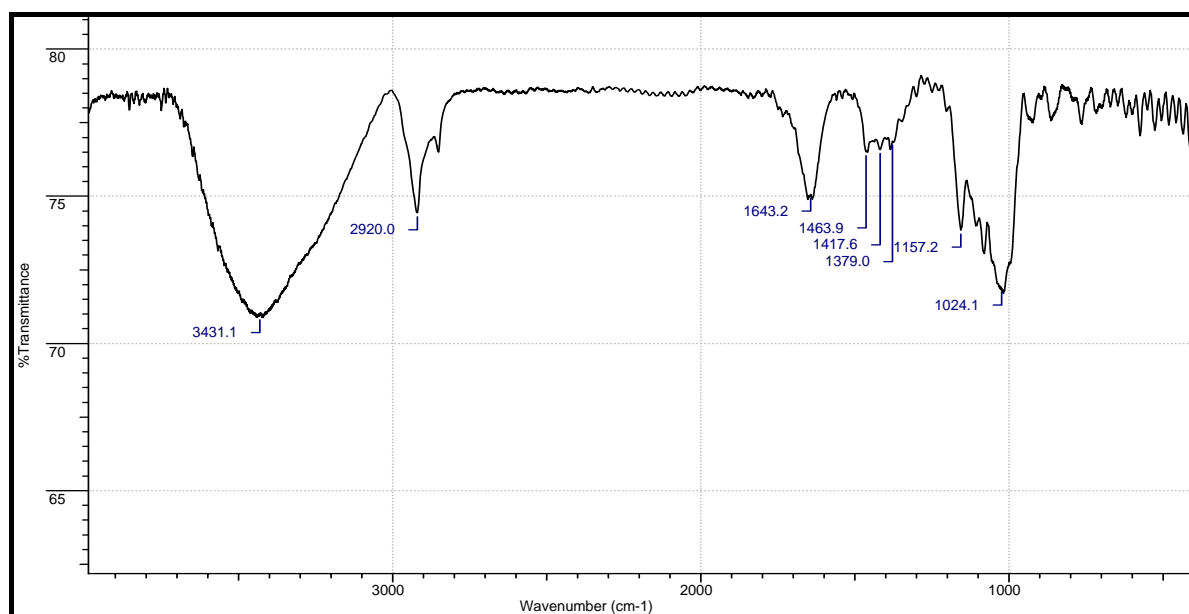


FIGURA 4.28: Espectro no infravermelho da amilose não derivada

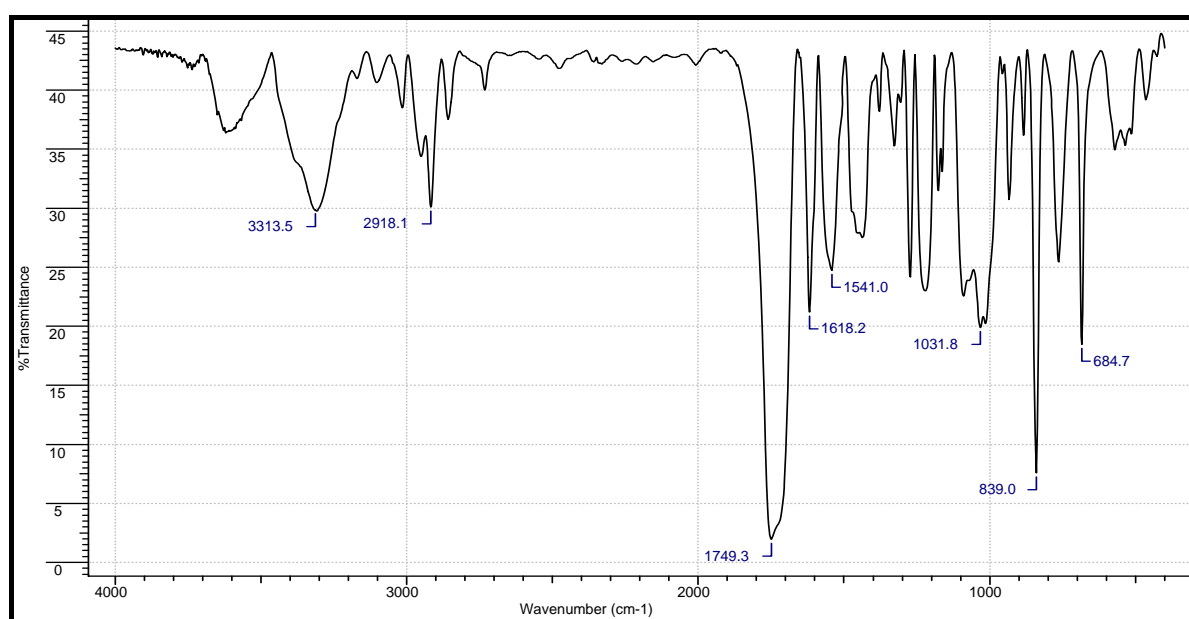


FIGURA 4.29: Espectro no infravermelho do FEQ-1 sintetizada

Os resultados obtidos das análises de infravermelho, para todas as fases estacionárias quirais preparadas, estão demonstrados na Tabela 4.5.

**TABELA 4.5:** Principais bandas no infravermelho encontradas para os carbamatos sintetizados

Substância	$\nu$ C=O ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ C-N ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ N-H ( $\text{cm}^{-1}$ )
FEQ - 1	1749,3	1.224,7	3313,5
FEQ - 2	1748,0	1202,0	3340,4
FEQ - 3	1717,9	1242,3	3324,2
FEQ - 4	1726,6	1221,0	3386,1

Os resultados das análises elementares (Tabela 4.6) mostram derivatizações quase completas dos grupos hidroxilas.

**TABELA 4.6:** Resultados da análise elementar para as FEQs sintetizadas

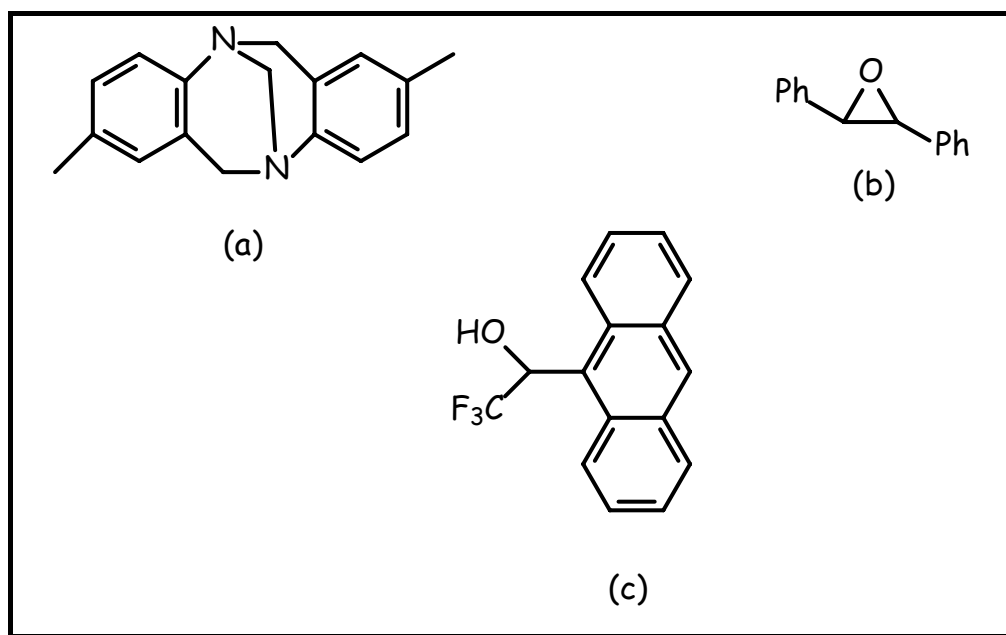
Substância	Massa Molar (g/mol)	Valores Teóricos (%)	Valores Experimentais (%)
FEQ -1 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$ )	602,9	C = 65,66 N = 6,96 H = 6,18	C = 65,35 N = 6,84 H = 6,15
FEQ -2 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_{14}\text{N}_3$ )	698,9	C = 56,65 N = 6,00 H = 5,29	C = 54,82 N = 5,95 H = 5,46
FEQ - 3 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$ )	602,9	C = 65,66 N = 6,96 H = 6,18	C = 60,10 N = 6,58 H = 5,60
FEQ - 4 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$ )	602,9	C = 65,66 N = 6,96 H = 6,18	C = 64,53 N = 6,46 H = 6,24

As FEQs foram obtidas com rendimento aproximado de 86% e um percentual de derivatização em torno de 97%. Os percentuais de derivatização foram calculados através dos resultados das análises elementares (Tabela 4.6) e são condizentes com os valores encontrados na literatura.<sup>120</sup>

O suporte APS-Nucleosil (500 Å, 7µm), preparado em nosso grupo, conforme consta na Parte Experimental p. 51, a partir de sílica Nucleosil (500 Å, 7µm), foi recoberto a 20% g/g com os carbamatos sintetizados.

As quatro fases estacionárias quirais foram empacotadas e avaliadas com padrões racêmicos (Figura 4.30), sendo a sua performance avaliada considerando-se os padrões cromatográficos: fator de retenção (k), fator de separação ( $\alpha$ ) e resolução (Rs).

Todas as quatro colunas apresentaram excelentes valores para os parâmetros cromatográficos e boa simetria das bandas cromatográficas. Com isso foram avaliadas para a separação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido.



**FIGURA 4.30:** Padrões Cromatográficos usados na avaliação das colunas quirais utilizadas neste trabalho. (a) ( $\pm$ ) - Base de Tröger; (b) ( $\pm$ ) - Óxido de Trans-Estilbeno e (c) ( $\pm$ )-1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol

#### 4.4 - AVALIAÇÃO DA ENANTIORRESOLUÇÃO DO ALBENDAZOL-SULFÓXIDO NAS FEQ-1, FEQ-2, FEQ-3 e FEQ-4, NO MODO REVERSO DE ELUIÇÃO

O modo reverso de eluição foi selecionado para este estudo levando-se em consideração o posterior acoplamento entre as colunas, extratora (RAMBSA) e analítica, utilizando-se cromatografia multidimensional, onde faz-se, inicialmente, necessário o uso da fase aquosa para exclusão protéica, evitando assim a precipitação das proteínas contidas no plasma bovino e o entupimento do sistema cromatográfico.

As colunas quirais foram avaliadas considerando-se os parâmetros cromatográficos: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ).

Para este estudo foram avaliados diferentes modificadores orgânicos: metanol, etanol e acetonitrila em diferentes proporções. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7.

As colunas tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) (FEQ-1) e tris(3,5-dimetóxfenilcarbamato) (FEQ-2), ambas de amilose, foram as que apresentaram melhores resultados de discriminação quiral para o ( $\pm$ )-ABZ-SO, tanto com o uso de etanol quanto com o uso de acetonitrila como modificadores orgânicos. Já as colunas tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose (FEQ-3) e a tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (FEQ-4) não apresentaram discriminação quiral em nenhuma das fases móveis utilizadas.

TABELA 4.7: Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para albendazol-sulfóxido no modo reverso de eluição

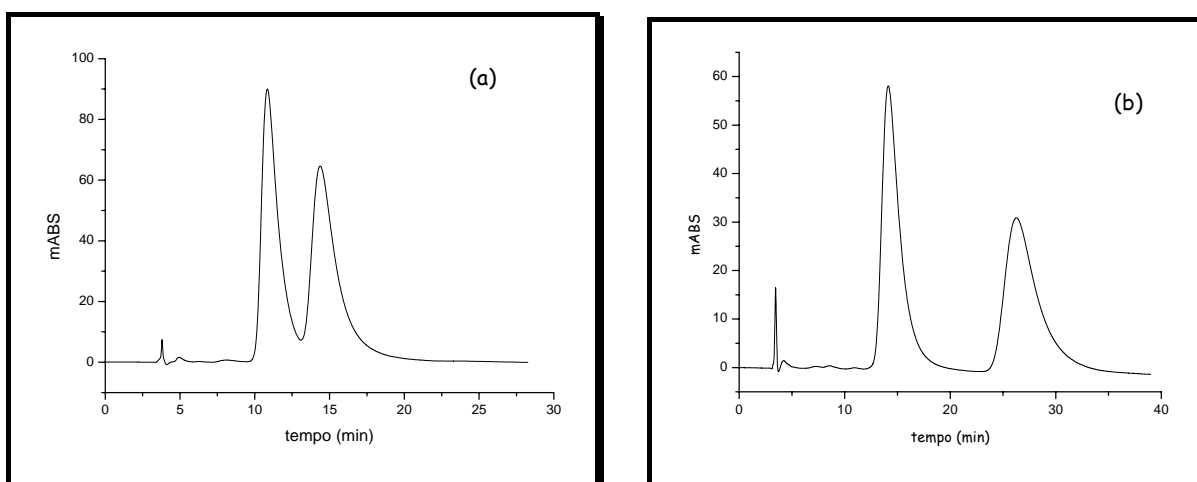
Fase Móvel \ FEQ	FEQ-1			FEQ-2			FEQ-3			FEQ-4		
	k <sub>1</sub>	α	R <sub>S</sub>	k <sub>1</sub>	α	R <sub>S</sub>	k <sub>1</sub>	α	R <sub>S</sub>	k <sub>1</sub>	α	R <sub>S</sub>
Água/EtOH (50:50)	3,10	2,12	2,61	1,80	1,51	1,66	0,93	-	-	0,45	-	-
Água/EtOH (30:70)	0,98	2,26	2,44	0,89	1,43	1,26	3,31	1,59	< 1,0	0,23	-	-
Água/ACN (50:50)	0,96	2,28	2,63	0,57	0,85	< 1,0	0,29	-	-	0,25	-	-
Água/ACN (70:30)	2,34	1,86	1,84	1,44	1,35	1,41	0,79	-	-	0,46	-	-
Água/MeOH (50:50)	*			6,63	1,44	< 1,0	3,13	-	-	1,77	-	-
Água/MeOH (30:70)	3,00	2,14	1,03	1,52	1,31	< 1,0	0,88	-	-	0,52	-	-

\* o composto não eluiu em 60 min.

Comparando-se às fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamato)s de amilose (FEQ-1) e celulose (FEQ-4) é clara a influência do polissacarídeo na discriminação quiral, uma vez que temos o mesmo substituinte em ambas as fases. A FEQ-1 de amilose apresentou excelentes valores para o fator de resolução, com valores de  $R_s$  iguais a 2,61; 2,63 e 2,44, enquanto que a correspondente de celulose (FEQ-4) não apresentou nenhuma enantiosseletividade.

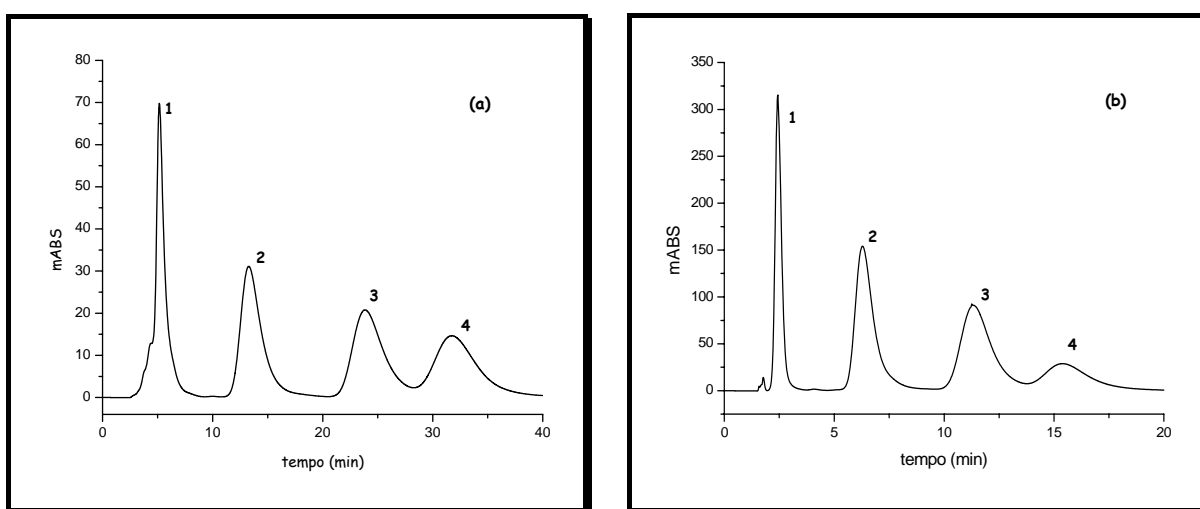
A influência dos substituintes no anel aromático dos carbamatos também é evidenciada nos resultados obtidos, onde a FEQ-1, que apresenta como substituintes grupamentos metílicos, mostrou melhor discriminação quiral para o albendazol-sulfóxido do que a FEQ-2, que apresenta grupos metóxi como substituintes. Porém, a FEQ-2 apresenta melhor enantiosseletividade que a FEQ-3, a qual não apresenta nenhum substituinte no anel aromático.

A seguir, são apresentados dois cromatogramas, para ilustrar as separações obtidas do albendazol-sulfóxido nas colunas tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) e a tris(3,5-dimetóxiifenilcarbamato), ambas de amilose.



**FIGURA 4.31:** Cromatogramas do albendazol-sulfóxido. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50), Vazão: 0,5 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm, em (a) Coluna tris(3,5-dimetóxiifenilcarbamato) de amilose e (b) Coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

As melhores condições cromatográficas conseguidas para a separação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido, sendo essas: emprego da FEQ 1, fase móvel EtOH/Água (50:50) e vazão de 0,5 mL/min, foram também avaliadas para a separação simultânea do ( $\pm$ )-ABZ-SO, do ABZ-SO<sub>2</sub> e do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Nesta primeira análise realizada, o tempo de análise para os quatro compostos foi muito longo (40 minutos), sendo, portanto, avaliada a vazão de 1,0 mL/min, onde obteve-se uma redução no tempo de análise para 20 minutos. Os cromatogramas estão ilustrados na Figura 4.32.



**FIGURA 4.32:** Cromatograma dos analitos (1): ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; (2): R-(+)-ABZ-SO; (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ-SO<sub>2</sub>. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50) e  $\lambda$ : 290 nm, coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.) em APS-Nucleosil (500Å, 7 $\mu$ m), em (a) vazão de 0,5 mL/min e (b) vazão de 1,0 mL/min.

#### 4.5 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE MULTIDIMENSIONAL

Em CLAE, a Cromatografia Multidimensional é utilizada através do acoplamento de duas ou mais colunas, com mecanismos de separação diferentes. As colunas são escolhidas em função das propriedades dos compostos a serem analisados.<sup>27</sup>

Este tipo de cromatografia tem sido muito utilizada para a extração *on-line* de amostras em matrizes biológicas e também na resolução de problemas de sobreposição de picos.<sup>27</sup>

Há três maneiras predefinidas para a utilização de Cromatografia Multidimensional:

- **On-line:** Consiste na utilização de duas ou mais colunas interligadas por válvulas;
- **In-line:** é a utilização de duas ou mais colunas sem ligações com válvulas, similar à utilização de uma ou mais pré-colunas no sistema;
- **Off-line:** é sempre a última escolha, quando não se consegue ajustar as condições para um sistema com colunas acopladas. Separam-se inicialmente os compostos de interesse entre si e também dos interferentes da matriz, coletam-se os mesmos, concentra-se e injeta-se em um segundo sistema para análise.

Como um exemplo de acoplamento *on-line* entre uma coluna extratora e uma coluna quiral, cita-se a análise dos enantiômeros do modafinil e seus dois principais metabólitos, o ácido modafínico e modafinil sulfona em plasma humano.<sup>109</sup>. Através do acoplamento de uma coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA a uma coluna quiral de polissacarídeo tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose foi possível fazer a quantificação simultânea dos compostos de interesse. Neste trabalho o plasma foi injetado diretamente na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA e as proteínas plasmáticas foram excluídas no volume morto da coluna. Após a exclusão protéica, os compostos foram transferidos para a coluna quiral e quantificados, sendo o acoplamento *on-line* escolhido para o desenvolvimento do método.

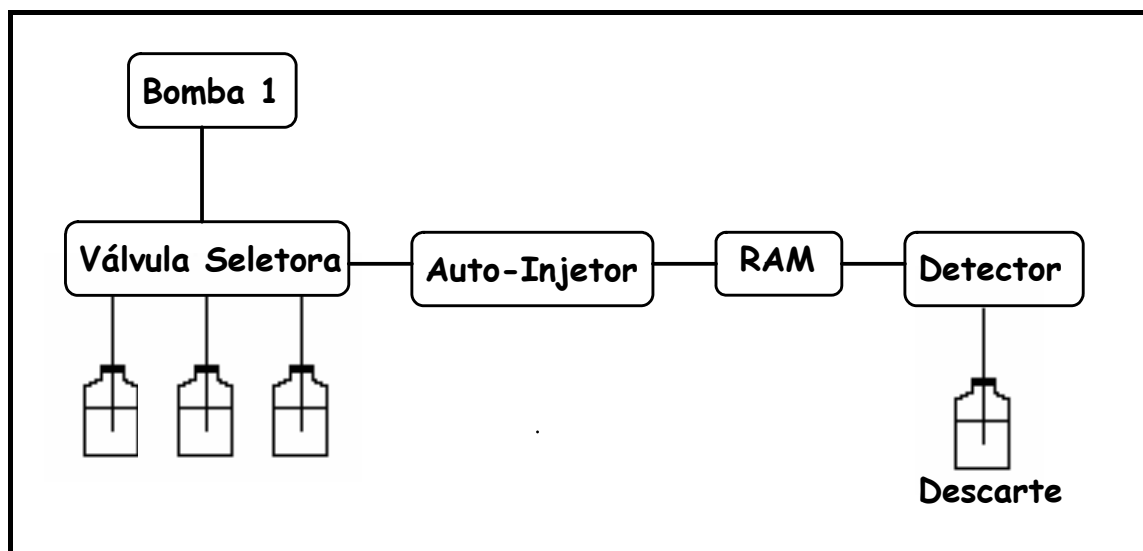
Para o desenvolvimento de métodos para a análise de fármacos e/ou metabólitos em fluidos biológicos através da cromatografia multidimensional *on-line*, faz-se necessário à investigação e ajuste de vários parâmetros. Inicialmente deve-se selecionar a fase móvel adequada para que se obtenha as melhores



condições de exclusão protéica, assim como, a exclusão de compostos endógenos. Posteriormente, avaliar a fase móvel que será utilizada na extração das micromoléculas de interesse da coluna de acesso restrito, com um adequado tempo de retenção e finalmente, as condições de vazão e fase móvel relacionadas à análise dos compostos de interesse na coluna analítica para então ser realizada a análise multidimensional.

Em análises envolvendo matrizes biológicas, no modo multidimensional, o ideal é que a transferência do analito de interesse para a coluna analítica ocorra em um menor tempo possível, evitando a interferência de compostos endógenos. Além disso, quando as colunas RAM-BSA e analíticas estão acopladas, ocorre uma mistura das fases móveis, que dependendo do tempo de acoplamento, pode influenciar a análise na coluna analítica.

Primeiramente foram avaliadas a exclusão das proteínas do plasma bovino e a extração dos enantiômeros do ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, nas colunas RAM-BSA C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>. A configuração do sistema cromatográfico utilizado é apresentada na Figura 4.33, e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 4.8.



**FIGURA 4.33:** Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos compostos em plasma bovino.

**TABELA 4.8:** Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão protéica e eluição dos analitos nas colunas RAM-BSA  $C_8$  e  $C_{18}$  selecionadas para o estudo.

Linha da Bomba	Tempo (min)	Evento
A	0,00 - 5,00	Exclusão das proteínas pela coluna RAM selecionada
B	5,01 - 15,00	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA
C	15,00 - 20,00	Limpeza da coluna RAM-BSA
A	20,00 - 25,00	Condicionamento da coluna RAM-BSA

Linha A: Tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5):EtOH (98:02)

Linha B: Tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5):EtOH (80:20)

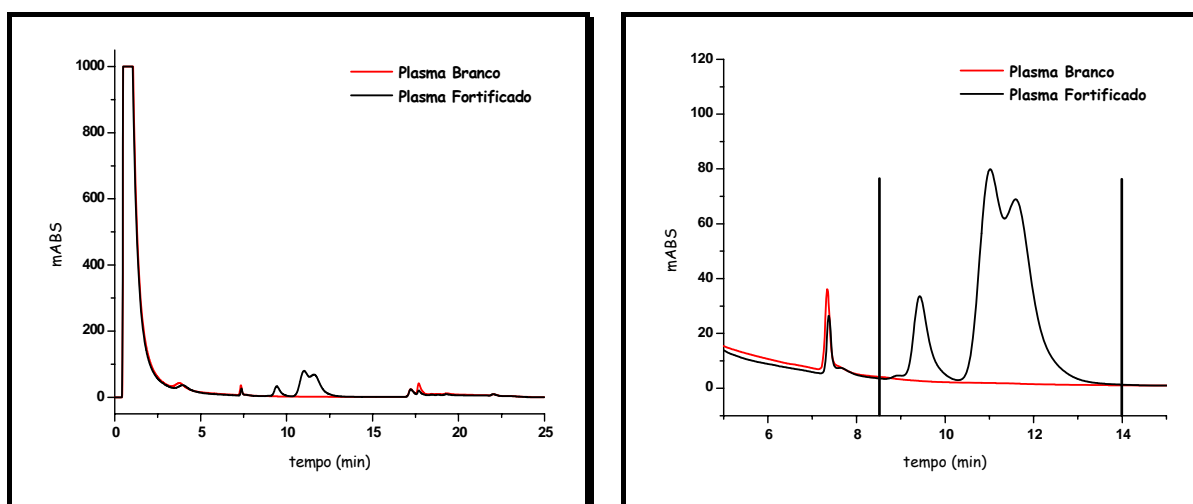
Linha C: ACN/Água/ISO (75:15:10)

Vazão de 1,0 mL/min

Ambas as colunas apresentaram resultados similares quanto à exclusão das proteínas do plasma bovino e quanto à extração dos analitos de interesse, assim as duas colunas poderiam ser utilizadas para estudos posteriores e, portanto, escolheu-se a RAM-C<sub>8</sub>-BSA.

Nas condições cromatográficas descritas na Tabela 4.8, os compostos de interesse apresentaram eficiente retenção, sendo esta maior que o tempo necessário para a exclusão das macromoléculas (>5 min), possibilitando que essas condições fossem utilizadas para o acoplamento com a coluna analítica.

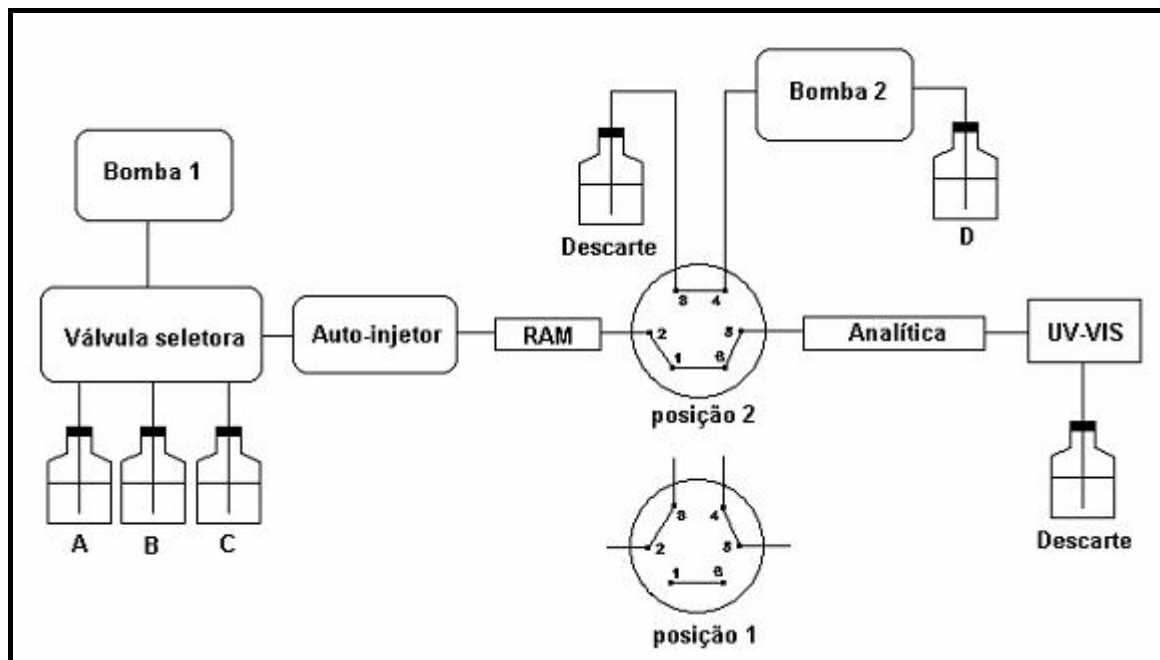
O cromatograma com o tempo de acoplamento (8,5 - 14,0 min) utilizado com o emprego da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA está ilustrado na Figura 4.34.



**FIGURA 4.34:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>, 5  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.). Condições cromatográficas: Fases móveis (A): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (98:02); (B): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (80:20) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm.

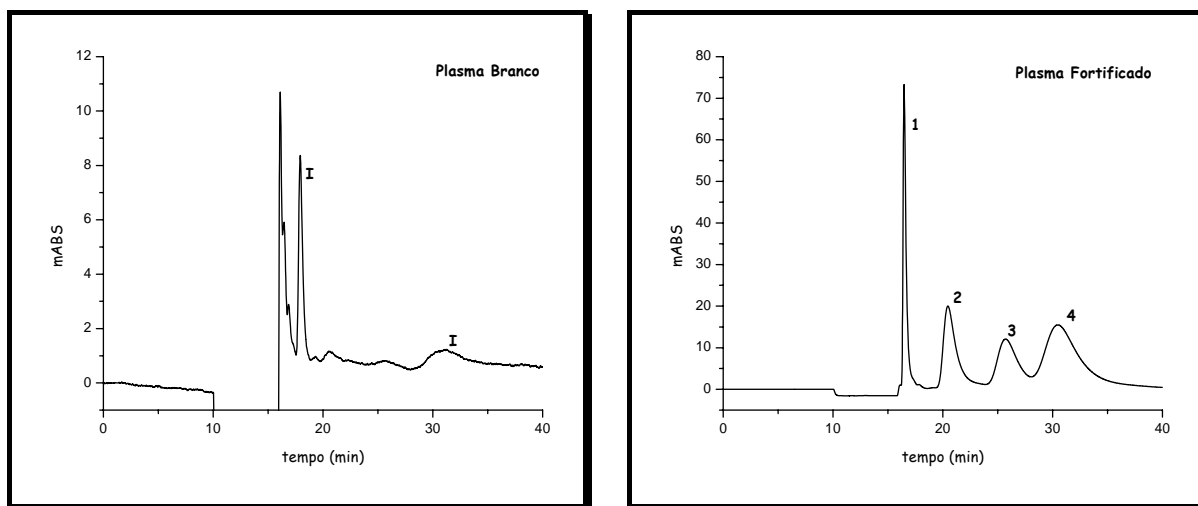
Utilizando-se um sistema cromatográfico, configurado para o modo multidimensional, composto por duas bombas, (Figura 4.39), acoplou-se a coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA à coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ 1).

A fase móvel utilizada na coluna quiral foi solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M; pH 7,5):EtOH (50:50).



**FIGURA 4.35:** Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1: colunas não acopladas; Posição 2: Colunas acopladas.

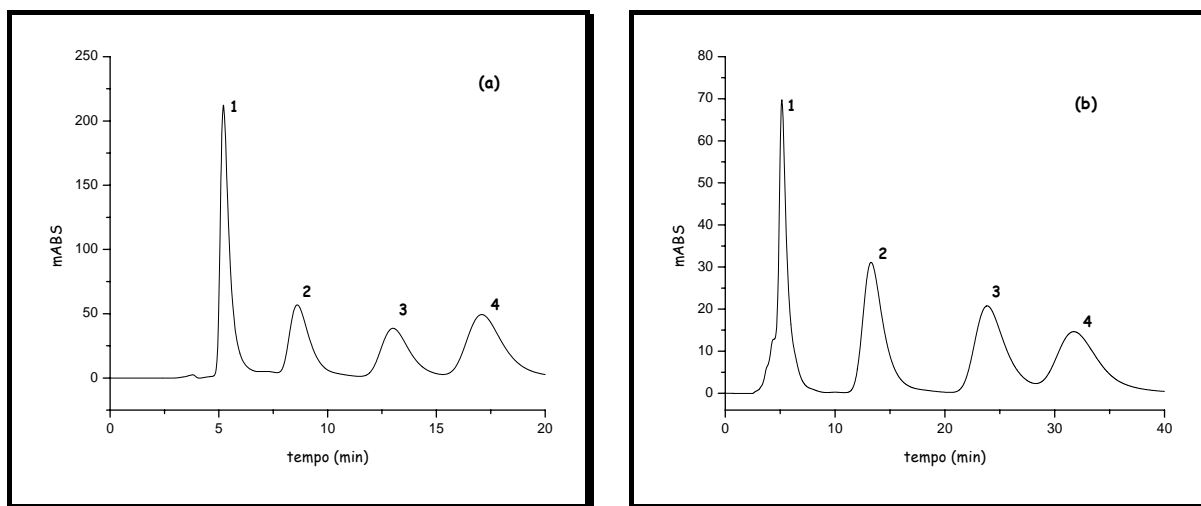
De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 4.36 foi obtida boa resolução para os quatro compostos. No entanto a quantificação não foi possível nessas condições, devido à presença de interferentes (I) co-eluindo com o  $\text{ABZ-SO}_2\text{-NH}_2$  e com o  $\text{ABZ-SO}_2$  (Figura 4.36).



**FIGURA 4.36:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (98:02); (B) Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):EtOH (80:20) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M pH 7,5):EtOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/mim; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. (I): Interferente; (1): ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (2): R-(+)- ABZ-SO, (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ-SO<sub>2</sub>.

A seletividade do método foi buscada com outro solvente polar orgânico em substituição ao etanol. Acetonitrila foi selecionada, já que com esse solvente também se obteve uma ótima enantiorresolução para os enantiômeros do albendazol-sulfóxido, como foi mostrado na Tabela 4.7 (p. 97). A FEQ 1 foi, então, comparativamente avaliada com 40% de acetonitrila.

Os cromatogramas da Figura 4.37 mostram os resultados obtidos para os diferentes solventes utilizados, sendo etanol e acetonitrila os respectivos modificadores orgânicos.



**FIGURA 4.37:** Cromatograma dos analitos (1): ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; (2): R-(+)-ABZ-SO; (3): S-(-)-ABZ-SO e (4): ABZ-SO<sub>2</sub>. Coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.) em APS-Nucleosil (500Å, 7µm), λ: 290 nm, vazão de 0,5 mL/min. Fase Móvel: (a) Água/EtOH (50:50) e (b) Água/ACN (60:40).

Com o intuito de estabelecer condições cromatográficas que propiciassem alta seletividade para os analitos de interesse, diferentes fases móveis para a exclusão protéica e, extração dos analitos, também foram avaliadas na coluna extratora.

As novas condições cromatográficas avaliadas na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA, estão descritas na Tabela 4.9. Vale ressaltar, que água foi substituída por solução tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5), com o intuito de promover uma retenção diferenciada para compostos endógenos presentes no plasma bovino. O perfil de exclusão protéica não foi influenciado quando se realizou essa substituição.

**TABELA 4.9:** Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão protéica e eluição dos analitos na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA.

Linha da Bomba	Tempo (min)	Evento
A	0,00 - 5,00	Exclusão das proteínas pela coluna RAM-BSA Vazão de 1,0 mL/min
B	5,01 - 15,00	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA Vazão de 0,5 mL/min
C	15,00 - 20,00	Limpeza da coluna RAM-BSA Vazão de 1,0 mL/min
A	20,00 - 25,00	Condicionamento da coluna RAM-BSA Vazão de 1,0 mL/min

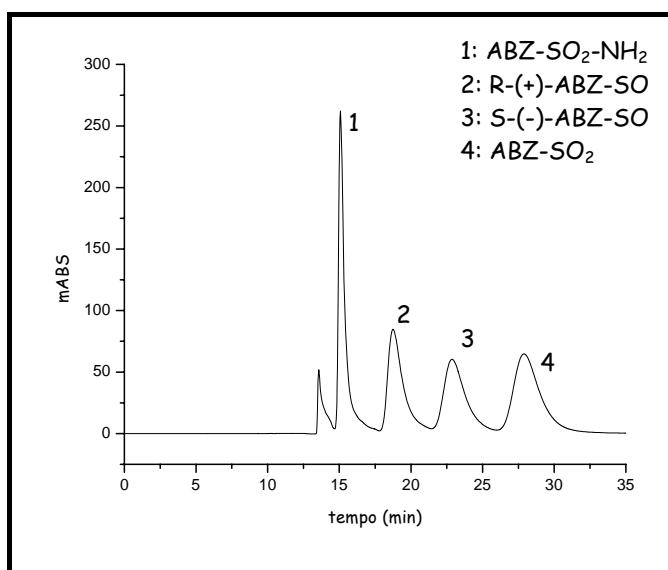
Linha A: Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5)

Linha B: Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40)

Linha C: ACN/Água/ISO (75:15:10)

Nas novas condições avaliadas, os compostos, (±)-ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> apresentaram retenção eficiente (>5 min) na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA, possibilitando o acoplamento com a coluna analítica.

O cromatograma obtido após o acoplamento das colunas (8,0-14,0 min) está demonstrado na Figura 4.38. As condições cromatográficas ótimas utilizadas para a validação do método estão descritas na Tabela 4.10.



**FIGURA 4.38:** Cromatograma obtido do plasma bovino fortificado com 10 µg/mL do (±)-ABZ-SO, 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>, 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 100 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm.



**TABELA 4.10:** Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão protéica e eluição dos analitos na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise dos metabólitos do albendazol na coluna quiral FEQ-1 (15,0 x 0,46 cm d.i.). Temperatura de 30°C.

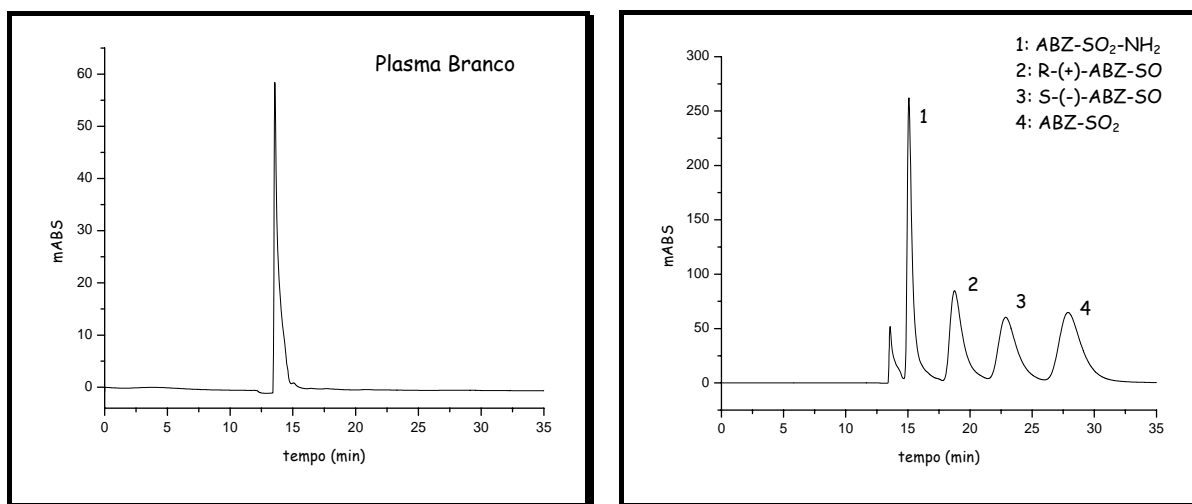
Tempo (min)	Evento
<b>BOMBA 1</b>	
0,00 - 5,00	FM: 100% Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5) [exclusão das proteínas pela coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 1,0 mL/min
5,01-14,00	FM: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) (extração dos compostos da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 0,5 mL/min
8,00-14,00	FM: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) [transferência dos compostos da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA para a coluna analítica]; vazão de 0,5 mL/min
14,01-25,00	FM: ACN:ÁGUA:ISO (75:15:10) (limpeza da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 1,0 mL/min
25,01-35,00	FM: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01; M pH 7,5) (condicionamento da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 1,0 mL/min
<b>BOMBA 2</b>	
0,00-8,00	FMI: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) [condicionamento da coluna analítica tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.)];
8,00-14,00	FM: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) (transferência dos compostos da coluna extratora para a coluna analítica);
14,00-35,00	FM: Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) (análise do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO), detecção Fluorescência Excitação: 290 nm e Emissão: 320 nm

## 4.6 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Com as condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol, ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, em amostras de plasma bovino, o método analítico foi validado de acordo com o protocolo proposto pelo FDA<sup>121</sup> e pela ANVISA<sup>122</sup> para métodos bioanalíticos. As figuras de mérito analítico avaliadas foram: seletividade, linearidade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e detecção, robustez e estabilidade.

### 4.6.1 - Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de plasma bovino, livre dos analitos (plasma branco), com análises da matriz biológica fortificada com os analitos. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 4.39, e mostra ser seletivo para as quatro bandas cromatográficas, não apresentando interferentes para nenhum composto a ser quantificado.

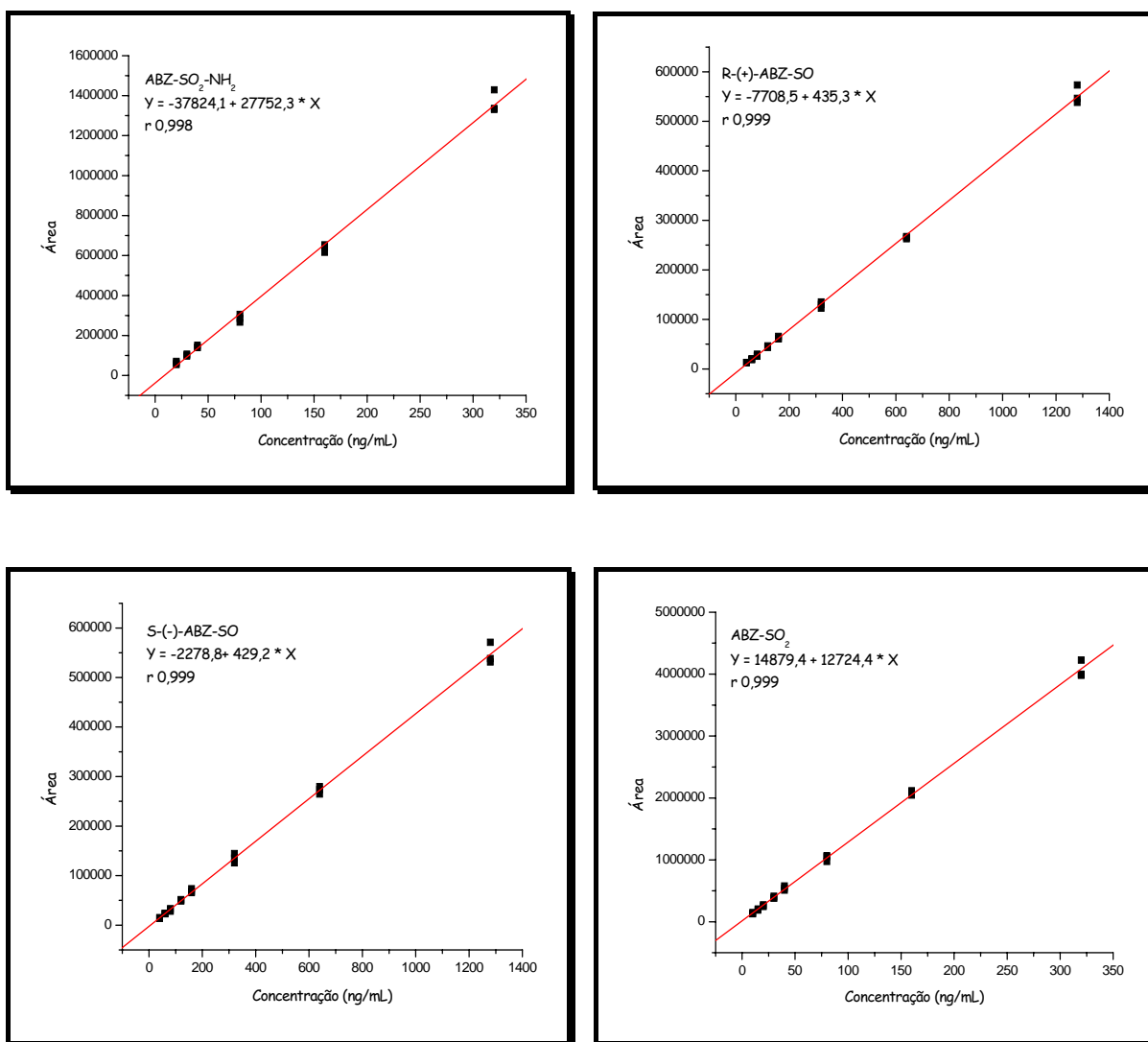


**FIGURA 4.39:** Cromatograma obtido do plasma branco e do plasma fortificado com 10  $\mu\text{g/mL}$  do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>, 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm.

#### 4.6.2 - Linearidade

Os intervalos de concentração utilizados na construção das curvas de calibração foram selecionados baseando-se na faixa de concentração já encontrados desses metabólitos em plasma de bovinos.<sup>24</sup>

As curvas de calibração para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 10,00; 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 80,00; 160,0 e 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 80,00; 160,0 e 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub> e de 80,00; 120,0; 160,0, 240,0 320,0; 640,0; 1280, 2560 ng/mL para o ( $\pm$ )-ABZ-SO. As amostras foram preparadas em plasma bovino, em triplicata e foram injetados 200  $\mu\text{L}$ . As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e estão apresentadas na Figura 4.40.



**FIGURA 4.40:** Curvas analíticas para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>

As curvas analíticas foram lineares nas faixas de 20,00 - 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, de 40,00 - 1280 ng/mL para o R-(+)-ABZ-SO, 40,00-1280 ng/mL para o S-(-)-ABZ-SO e de 10,00 - 320,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

Os coeficientes de correlação linear (r) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 15%, e a exatidão apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal de concentração em todas as

concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 15-20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos.<sup>121,122</sup>

As figuras de mérito avaliadas foram realizadas com amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração:

- Baixa: 24,00 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 48,00 ng/mL para o R-(+)-ABZ-SO, 48 ng/mL para o S-(-)-ABZ-SO e 12,00 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>
- Média: 150,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 500,0 ng/mL para o R-(+)-ABZ-SO, 500,0 ng/mL para o S-(-)-ABZ-SO e 150,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>
- Alta: 300,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 1000 ng/mL para o R-(+)-ABZ-SO, 1000 ng/mL para o S-(-)-ABZ-SO e 300,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>

#### 4.6.3 - Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intradia e interdias do método foram avaliadas analisando-se quintuplicata dos três controles de qualidade, em um mesmo dia e em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações avaliadas (Tabela 4.11).

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação entre 0,76 e 7,99 considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 89,9 e 114% das concentrações nominais. Portanto, todos os valores estão dentro dos critérios de aceitação do método, ou seja, com variabilidades menores que 15%.

**TABELA 4.11:** Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=5) em plasma bovino

Concentração (ng/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
24,00	114	3,70	114	3,58	112	3,59	113	3,62
150,0	114	3,27	104	5,98	98,8	2,56	105	3,93
300,0	112	4,28	99,6	5,45	103	1,51	104	3,75
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
48,00	109	6,96	99,8	5,48	111	6,65	106	6,36
500,0	113	0,76	98,1	2,66	108	1,39	106	1,60
1000	114	5,77	96,0	2,72	111	4,35	107	4,28
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
48,00	109	4,19	87,9	7,99	89,9	2,17	95,5	4,78
500,0	105	4,18	97,0	3,22	104	2,61	101,7	3,34
1000	114	2,88	91,2	6,99	108	2,42	104,6	4,07
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
12,00	104	2,03	99,8	1,92	102	1,31	102	1,75
150,0	103	3,92	105	3,42	101	2,51	103	3,28
300,0	111	2,97	102	3,87	101	1,97	105	2,93

A precisão e exatidão do método foram também avaliadas, através do teste cego, onde foram analisadas amostras de concentrações desconhecidas

ao analista. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.12, e todos estão de acordo com os critérios de aceitação para o método.

**TABELA 4.12:** Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>			
Amostra 1	67,20	1,63	114
Amostra 2	144,0	1,07	114
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	224,0	1,25	97,2
Amostra 2	480,0	4,05	104
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	224,0	4,52	94,4
Amostra 2	480,0	3,64	102
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>			
Amostra 1	67,20	3,82	105
Amostra 2	144,0	2,78	107

#### 4.6.4 - Recuperação

Os percentuais de eficiência de extração para os quatro analitos, em cada concentração, foram calculados pela razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em plasma bovino (n=5) com os resultados das amostras preparadas em solvente (n=5), onde utilizou-se ACN:tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5) (40:60). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.13.

A eficiência de extração se mostrou precisa e exata para todos os compostos nas três diferentes concentrações analisadas e demonstrou que a coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA foi eficiente na extração dos analitos do plasma bovino e na transferência destes para a coluna analítica.

**TABELA 4.13:** Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=5)

Analito (ng/mL)	Recuperação (%)	Analito (ng/mL)	Recuperação (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>		<b>R-(+)-ABZ-SO</b>	
24,00	84,4	48,00	88,4
150,0	98,0	500,0	97,1
300,0	95,6	1000	92,5
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>		<b>S-(-)-ABZ-SO</b>	
12,00	93,7	48,00	97,1
150,0	99,7	500,0	100
300,0	103	1000	103

#### 4.6.5 - Limites de Quantificação e Detecção

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras contendo concentrações decrescentes dos analitos até que os valores de precisão e exatidão de amostras extraídas (n=3) fossem no intervalo de 15 - 20% de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado, obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector. A Tabela 4.14 mostra os limites de quantificação e detecção para os compostos estudados.



**TABELA 4.14:** ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3).

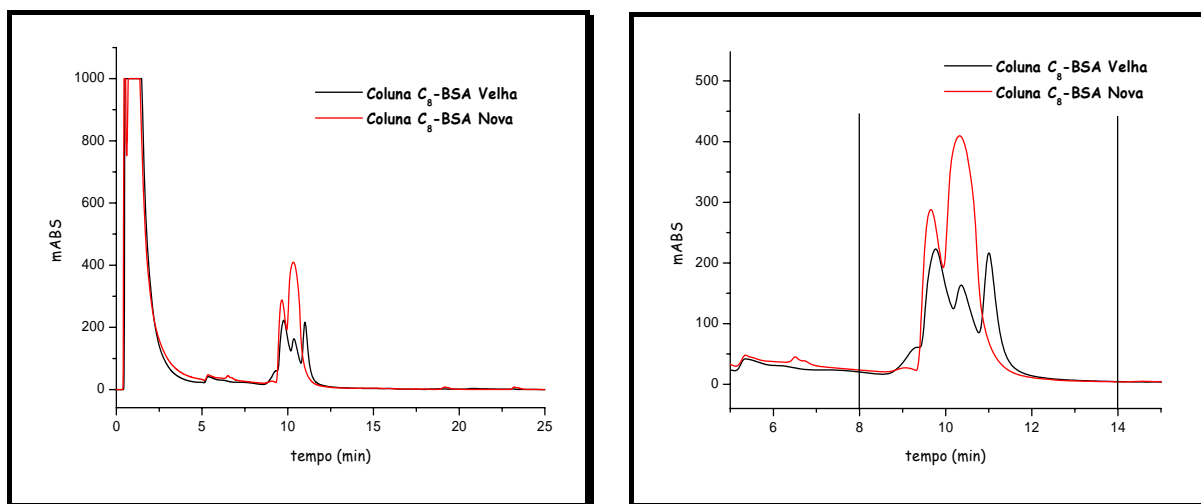
Analito	Limite de Quantificação (ng/mL)	Limite de Detecção (ng/mL)
ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	20,00	10,00
R-(+)-ABZ-SO	40,00	30,00
S-(-)-ABZ-SO	12,00	10,00
ABZ-SO <sub>2</sub>	6,000	5,000

#### 4.6.6 - Robustez

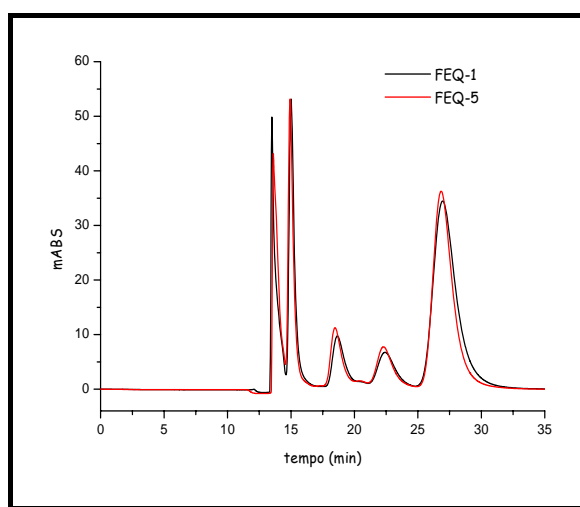
A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Um dos parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método é substituição das colunas utilizando diferentes lotes ou fabricantes. Como ambas as colunas são preparadas em nosso laboratório, nada melhor então que avaliá-las. A robustez do método foi avaliada através da substituição de ambas as colunas, a coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA e a coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

A Figura 4.41 apresenta os cromatogramas comparativos entre duas colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA avaliadas, onde é possível verificar o mesmo tempo de acoplamento (8,0 - 14,0 min) entre elas. Já na Figura 4.42 é possível verificar a comparação entre duas colunas quirais analíticas, que apresentaram o mesmo tempo de retenção para todos os compostos, com o mesmo perfil de separação quiral.

Os valores de precisão e exatidão calculados para as diferentes colunas ficaram todos dentro dos critérios de aceitação do método, ou seja, com variabilidades menores que 15%.



**FIGURA 4.41:** Cromatogramas comparativos entre duas colunas RAM- $C_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) preparadas separadamente. Condições cromatográficas: Fases móveis (A): tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B): tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10), vazão de 1,0 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.



**FIGURA 4.42:** Cromatogramas comparativos entre duas colunas analíticas preapraradas. Plasma fortificado com 10  $\mu$ g/mL do ( $\pm$ )-ABZ-SO, 5,0  $\mu$ g/mL ABZ-SO<sub>2</sub>, 5,0  $\mu$ g/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, com acoplamento das colunas RAM- $C_8$ -BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $KH_2PO_4$  (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/mim; volume de injeção: 200  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.

#### 4.6.8 - Estabilidade das Amostras

##### 4.6.8.1 - Estabilidade durante Ciclos de Degelo

As amostras foram preparadas, nas três concentrações dos controles de qualidade do método, e analisadas imediatamente (tempo zero) e depois de congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nos tempos especificados (24, 48 e 72 horas) as amostras foram degeladas, a temperatura ambiente, e analisadas. A Tabela 4.15 apresenta os valores de precisão e exatidão das replicatas ( $n=3$ ) para os três ciclos de degelo.

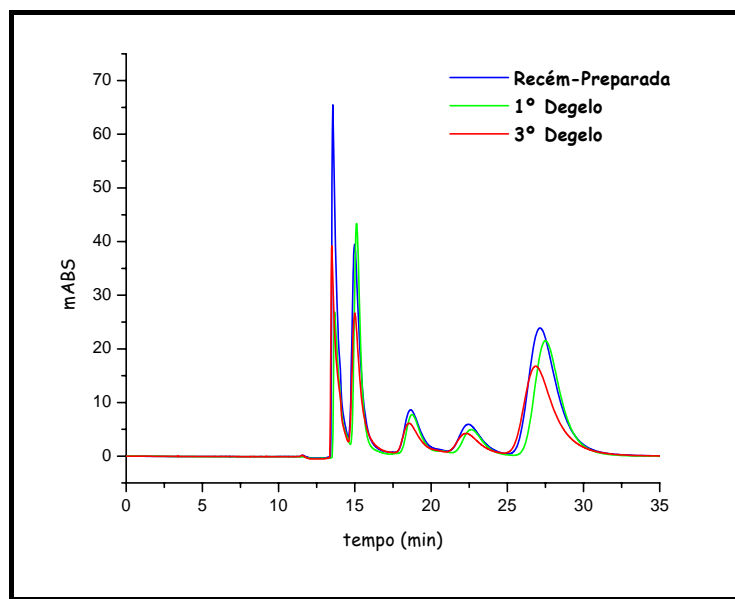
Através dos dados obtidos verifica-se que o  $\text{ABZ-SO}_2\text{-NH}_2$  se manteve estável por dois ciclos de degelo, uma vez que para o terceiro ciclo os valores para exatidão ficaram acima dos limites de 15% de variação do valor teórico esperado.

Já os dois enantiômeros do  $\text{ABZ-SO}$  se mantiveram estáveis por três ciclos de degelo. Enquanto que o valor médio encontrado para as três concentrações do  $\text{ABZ-SO}_2$ , acima do limite de 15% de exatidão do valor teórico esperado, mostrou que este composto é instável e já no segundo ciclo de degelo a sua concentração sofreu um grande decaimento alcançando valores em torno de 25% da concentração nominal.

A Figura 4.43 mostra os cromatogramas das amostras recém-preparadas, do primeiro ciclo e do terceiro ciclo de degelo das amostras.

**TABELA 4.15:** Resultados do estudo de estabilidade a ciclos de degelo para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3).

Analito (ng/mL)	Tempo Zero		1º Ciclo		2º Ciclo		3º Ciclo	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
24,00	1,10	112	3,63	114	4,42	110	4,44	84,2
150,0	0,45	94,0	1,29	97,9	0,95	87,0	7,88	73,3
300,0	0,67	96,3	1,51	98,4	0,97	88,8	7,67	79,8
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
48,00	5,42	109	1,53	102	4,01	95,7	2,00	104
500,0	2,06	113	0,78	110	0,48	99,5	8,88	90,1
1000	0,11	99,7	1,29	108	1,23	98,7	6,63	94,8
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
48,00	2,77	92,9	3,99	107	3,61	94,9	0,84	89,3
500,0	0,92	107	1,56	109	0,23	100	1,99	87,0
1000	0,82	109	2,21	97,5	0,19	96,2	7,52	86,3
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
12,00	0,68	105	0,69	98,4	0,61	81,3	1,70	68,5
150,0	0,69	103	0,52	92,4	0,22	75,6	7,48	61,8
300,0	0,37	109	0,46	94,5	0,37	72,5	7,57	64,0



**FIGURA 4.43:** Cromatogramas dos testes de estabilidade para os ciclos de degelo, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.

#### 4.6.8.2 - Estabilidade de Curta Duração

As amostras preparadas nas concentrações dos controles de qualidade foram analisadas imediatamente e depois deixadas em repouso a temperatura ambiente na bancada por seis horas.

A estabilidade das amostras durante a permanência no auto-injetor foi avaliada durante um período de dezesseis horas. Esses tempos foram estipulados levando em consideração o tempo necessário para o preparo e análise de todas as amostras utilizadas na obtenção da curva analítica.

Todas as amostras se mantiveram estáveis durante essas duas avaliações, com coeficientes de variação e exatidão em concordância com os limites de aceitação do método.<sup>121,122</sup> A Tabela 4.16 mostra os valores de precisão e exatidão obtidos nas avaliações de estabilidade de curta duração.

**TABELA 4.16:** Resultados do estudo de estabilidade do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de plasma bovino (n=3), nas avaliações de estabilidade de curta duração.

Analito (ng/mL)	Tempo Zero (recém-preparadas)		Bancada (6 horas)		Auto-Injetor (16 horas)	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>						
24,00	1,10	112	0,76	108	1,77	111
150,0	0,45	94,0	1,05	94,6	0,79	93,3
300,0	0,67	96,3	0,59	95,1	0,56	94,7
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>						
48,00	5,42	109	0,79	109	1,44	112
500,0	2,06	113	0,31	113	2,16	114
1000	0,11	99,7	0,68	101	0,37	98,2
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>						
48,00	2,77	92,9	2,27	100	1,55	99,5
500,0	0,92	107	1,59	108	1,05	106
1000	0,82	109	0,99	110	0,19	113
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>						
12,00	0,68	105	3,48	103	0,31	101
150,0	0,69	103	0,54	103	0,80	100
300,0	0,37	109	0,19	109	0,17	109

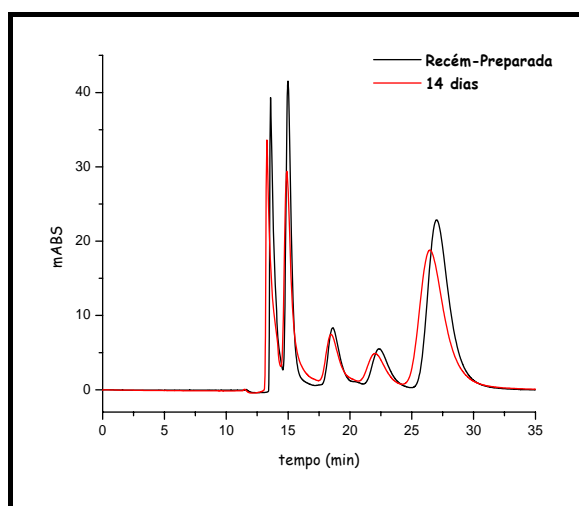
#### 4.6.8.3 - Estabilidade de Longa Duração

A estabilidade de longa duração é realizada com o intuito de estabelecer o tempo máximo em que amostras podem permanecer armazenadas após a coleta, antes de serem analisadas.

Da mesma forma, as amostras foram preparadas nas concentrações controle de qualidade e analisadas imediatamente (tempo zero) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram degeladas uma única vez e analisadas nos seguintes tempos 24, 48, 72 horas, e após 7 e 14 dias.

As amostras mostraram serem estáveis durante um período de sete dias para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e para o R-(+)-ABZ-SO, estáveis por 72 horas para o S-(-)-ABZ-SO e durante 24 horas para o ABZ-SO<sub>2</sub>. Após esses períodos a exatidão mostrou valores maiores que os de 15% de variação.

A Figura 4.44 mostra os cromatogramas das amostras recém-preparadas e após 14 dias de preparo.



**FIGURA 4.44:** Cromatogramas teste de estabilidade de longa duração, com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.

As Tabelas 4.17 e 4.18 mostram os valores de precisão e exatidão para as avaliações de estabilidade de longa duração.

**TABELA 4.17:** Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de plasma, fortificadas com ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, armazenadas a -20°C.

Analito (ng/mL)	Tempo Zero		24 horas		48 horas		72 horas	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
24,00	1,10	112	1,79	111	2,59	107	0,59	108
150,0	0,45	94,0	0,27	98,2	1,46	88,8	1,23	85,8
300,0	0,67	96,3	1,72	95,1	0,59	91,1	2,74	86,5
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
48,00	5,42	109	1,07	103	1,39	98,2	2,93	106
500,0	2,06	113	2,68	108	1,27	110	3,32	103
1000	0,11	99,7	0,20	107	1,18	105	4,32	99,1
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
48,00	2,77	92,9	4,11	104	2,57	99,6	0,65	89,0
500,0	0,92	107	7,25	108	1,23	106	3,25	103
1000	0,82	109	1,02	98,8	0,57	102	0,63	110
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
12,00	0,68	105	0,96	95,4	0,43	84,6	2,29	81,4
150,0	0,69	103	0,46	91,7	1,51	79,9	4,80	75,2
300,0	0,37	109	0,23	98,7	0,42	74,0	3,00	68,5



**TABELA 4.18:** Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de plasma, fortificadas com ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, armazenadas a -20°C.

Analito (ng/mL)	Tempo Zero		7 dias		14 dias	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>						
24,00	1,10	112	0,42	107	6,70	83,6
150,0	0,45	94,0	0,24	86,5	6,83	79,3
300,0	0,67	96,3	0,51	85,2	0,73	77,4
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>						
48,00	5,42	109	3,08	90,5	0,51	84,4
500,0	2,06	113	1,34	97,5	1,00	84,3
1000	0,11	99,7	1,03	88,4	0,37	84,6
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>						
48,00	2,77	92,9	8,91	76,9	3,29	58,3
500,0	0,92	107	0,54	84,2	1,31	84,3
1000	0,82	109	1,56	80,1	0,93	81,3
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>						
12,00	0,68	105	1,85	73,6	5,20	46,4
150,0	0,69	103	0,28	73,0	6,44	70,2
300,0	0,37	110	0,54	66,1	0,39	63,9

#### 4.6.8.4 - Estabilidade das Amostras em Solução

As amostras foram preparadas em metanol e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras em solução foram analisadas recém-preparadas (tempo zero) e em dias alternados e se mantiveram estáveis durante um período de cinco dias.

#### 4.6.8.5 - Estabilidade da Matriz Biológica

Paralelamente com todas as avaliações de estabilidade observou-se que a matriz biológica permaneceu estável nas condições estudadas, sem qualquer ocorrência de interferentes originadas da degradação do plasma bovino.

### 4.7 - PROBLEMAS ENCONTRADOS DURANTE A VALIDAÇÃO DO MÉTODO

No terceiro dia dos testes de reprodutibilidade e repetibilidade, utilizando as colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA e FEQ-1, os valores de exatidão apresentaram desvios superiores a 15%, devido à perda de performance da coluna RAM- $\text{C}_8$ -BSA. Esta perda de performance foi ocasionada pelo grande volume de plasma bovino injetado (15 mL) até aquele momento e, conseqüentemente, ocasionou a perda de performance também da coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, prejudicando então a validação do método.

Para contornar esse problema foi preparada uma nova coluna  $\text{C}_8$ -BSA. A coluna analítica foi desempacotada, lavada com, metanol, isopropanol, hexano, peneirada e re-empacotada. O intuito era averiguar a possibilidade de se reaproveitar a fase estacionária quiral, após sucessivas lavagens com solventes orgânicos.

No entanto, esse procedimento não foi o suficiente para recuperar totalmente a fase quiral, embora, após o re-empacotamento, a coluna tenha eficiência para a resolução dos metabólitos do albendazol, a mesma não

---

---

apresentou bons resultados de precisão e exatidão na análise dos compostos em plasma bovino.

Assim, uma nova coluna quiral foi preparada e, novas amostras de plasma bovino, fortificadas com os analitos, foram analisadas. Todos os valores de precisão e exatidão mostraram-se adequados (< 15%) (Tabela 4.19).

A Tabela 4.19 apresenta todos os dados obtidos para amostra uma comparação entre a FEQ-1 antes e depois de perda de performance, depois de ter sido lavada com solvente orgânico e re-empacotada e da nova fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-5) preparada.

TABELA 4.19: Tabela comparativa entre as colunas analíticas quirais.

Analito (ng/mL)	FEQ-1 (Inicial)		FEQ-1 (Após 150 análises x 200 µL)		FEQ-1 (Re-empacotada)		FEQ-5 (Recém- preparada)	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
24,00	3,70	114	12,9	78,9	1,22	118	3,59	112
150,0	3,27	114	4,47	75,7	1,61	99,0	2,56	98,8
300,0	4,28	112	1,31	93,5	2,35	98,5	1,51	103
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
48,00	6,96	109	12,01	98,6	3,28	112	6,65	111
500,0	0,76	113	4,69	106	1,39	107	1,39	108
1000	5,77	114	2,58	105	2,61	110	4,35	111
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
48,00	4,19	108	7,69	69,2	11,59	81,5	2,17	89,9
500,0	4,18	104	2,70	103	2,20	103	2,61	104
1000	2,88	114	1,06	95,8	1,53	107	2,42	108
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
12,00	2,03	104	5,29	109	5,15	92,2	1,31	101
150,0	3,92	103	4,04	105	1,78	98,5	2,51	101
300,0	2,97	111	3,11	110	1,96	99,7	1,97	101

Esses dados permitem concluir que a coluna extratora RAM-C<sub>8</sub>-BSA e a analítica quiral, mantiveram a eficiência da exclusão das proteínas e análise dos analitos respectivamente, até um volume de 15 e 30 mL de plasma bovino injetado. Após esse volume, as colunas foram substituídas por duas novas colunas

e pode-se observar o mesmo perfil cromatográfico em ambas as colunas, implicando que o método é robusto.

A grande dificuldade em manter a performance das colunas na análise dos anti-helmínticos no plasma bovino deve-se ao elevado volume de injeção (200  $\mu$ L) necessário para obter a sensibilidade desejada para todos os compostos.

Desta forma, novas investigações de sistemas de detecção para os metabólitos do albendazol se faz necessário. Métodos envolvendo o uso de espectrometria de massas como sistema de detecção são interessantes neste caso, onde maior sensibilidade da técnica pode propiciar menores volumes de injeção e conseqüentemente um tempo de vida maior para as colunas envolvidas.

#### **4.8 - SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA DOS ENANTIÔMEROS DO ALBENDAZOL-SULFÓXIDO**

A separação semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido se fez necessária para determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do albendazol sulfóxido, nas condições cromatográficas utilizadas no método.

Para a realização de uma separação preparativa ou semipreparativa o primeiro passo é a otimização das condições de separação do analito em escala analítica, nesta etapa estão incluídas a escolha da fase estacionária e a composição da fase móvel. A otimização para um fator de retenção ( $k$ ) pequeno possibilita que a separação seja obtida em um menor tempo e com menor consumo de solventes. Já valores máximos para o fator de separação ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ) permitem que maiores quantidades do composto seja injetado na coluna cromatográfica sem perda de resolução.<sup>123</sup>

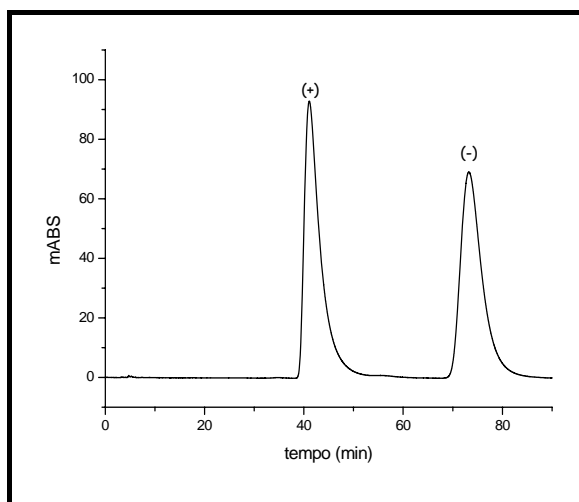
As principais fases estacionárias quirais atualmente utilizadas em cromatografia preparativa são as fases do tipo Pirkle e as de polissacarídeos. Outras fases como as fases quirais de proteínas, ciclodextrinas, antibióticos também estão disponíveis, mas devido a baixa capacidade de carga e o elevado custo envolvido faz com que estas sejam menos atrativas.<sup>124</sup>

Para a separação semipreparativa partiu-se da melhor condição estabelecida por ZONGDE *et al.*<sup>125</sup>. Neste trabalho os autores realizaram uma investigação de forma sistemática para a separação do ABZ-SO utilizando coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, no modo normal de eluição, com misturas de hexano e diferentes álcoois como modificadores orgânicos. Ainda neste trabalho foi realizado o escalonamento para a separação semipreparativa e avaliada a sobrecarga da coluna.

O modo normal de eluição foi preferido ao modo reverso, por ser possível o isolamento dos analitos separados através da simples evaporação do solventes.

Em condições analíticas os enantiômeros do alendazol sulfóxido eluíram em 41,1 mim e 73,5 mim e os parâmetros  $\alpha$  e  $R_s$  foram de 1,90 e 3,73 respectivamente (Figura 4.45).

A Figura 4.45 mostra a separação analítica dos enantiômeros do ABZ-SO na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, empregando hexano/etanol como fase móvel.

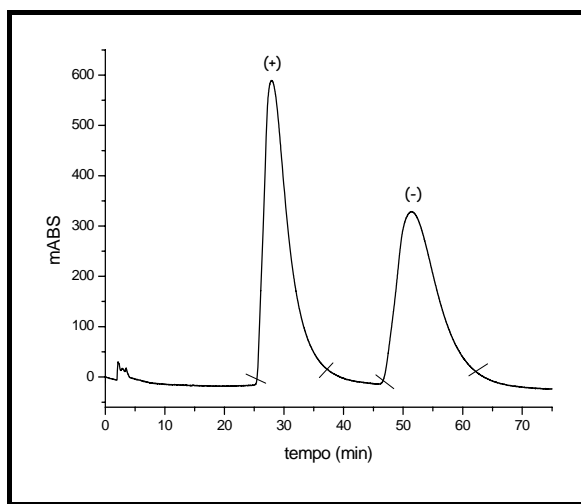


**FIGURA 4.45:** Separação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido em escala analítica. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15,0 x 0,46 cm d.i). Fase móvel: hexano/etanol (80:20); Vazão: 0,5 mL/min; V.injeção: 20 µL e λ:290 nm.

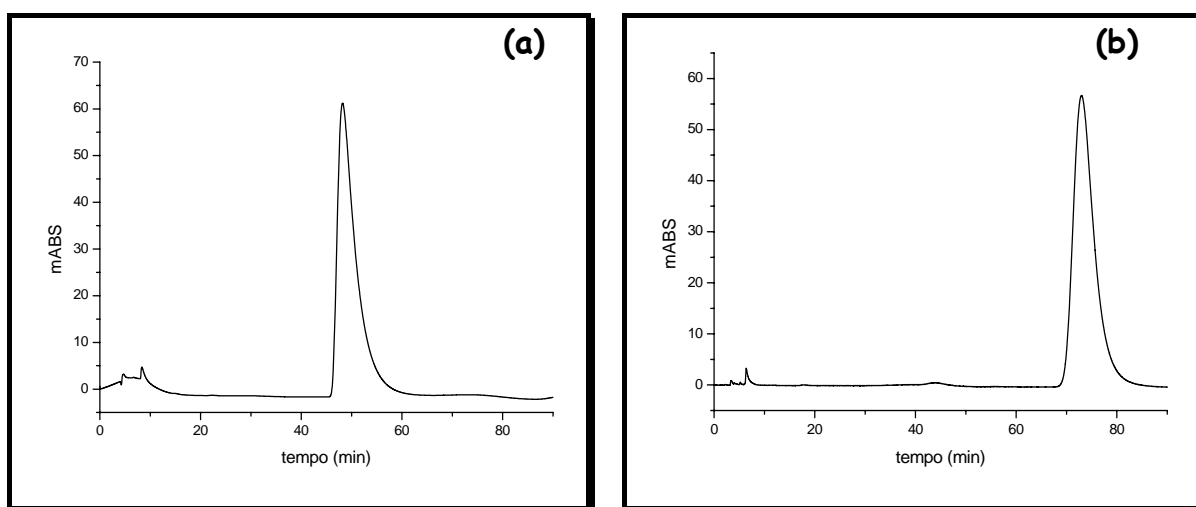
A Figura 4.46 ilustra a separação semipreparativa dos enantiômeros do ABZ-SO. Nesta separação foram realizadas 8 injeções (500 µL) de uma solução de concentração 4,0 mg/mL, totalizando 16,0 mg de racemato.

A pureza enantiomérica foi determinada na coluna analítica tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. A Figura 4.57 mostra os cromatogramas de determinação enantiomérica do (a) R-(+)-ABZ-SO e (b) S-(-)-ABZSO.

A Tabela 4.20 apresenta os dados obtidos na separação em escala semipreparativa do albendazol-sulfóxido.



**FIGURA 4.46:** Cromatograma da separação em escala semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido. Coluna semipreparativa: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20,0 x 0,7 cm d.i.). Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v). Vazão: 3,0 mL/min; V.injeção: 500 µL e λ:290nm.



**FIGURA 4.47** Cromatograma para determinação da pureza do albendazol-sulfóxido. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm d.i.). Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v). Vazão: 3,0 mL/min; V.injeção: 20 µL e λ:290nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-ABZ-SO (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-ABZ-SO



**TABELA 4.20:** Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido

	<b>1° enantiômero</b>	<b>2° enantiômero</b>
	<b>(R)-(+)-ABZ-SO</b>	<b>(S)-(-)-ABZ-SO</b>
Massa obtida (mg)	7,6	6,5
Pureza enantiomérica (%)	98,6	99,2
Rendimento (%)	95,0	81,0
Excesso enantiomérico (%)	97,2	98,4
$\alpha_D$ , metanol, 25°C	+88,6°	-90,4°
Produtividade (mg/h)	0,81	0,69

# *CONCLUSÕES*

## 5 -CONCLUSÕES

A síntese do albendazol-sulfóxido e do albendazol-sulfona foi realizada com sucesso utilizando o complexo aquo(N-óxido de piridina) oxo diperoxo molibdênio (VI), onde através de uma única síntese os dois metabólitos de interesse foram produzidos.

As fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) e a tris(3,5-dimetóxfenilcarbamato) de amilose, ambas em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm, 20% g/g, 15,0 x 0,46 cm d.i.) mostraram excelente enantiosseletividade para os enantiômeros do albendazol-sulfóxido no modo reverso de eluição, com etanol ou acetonitrila como modificadores orgânicos.

A fase tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm, 20% g/g, 15,0 x 0,46 cm d.i.) mostrou ser eficiente para a enantiosseparação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido, utilizando-se etanol como modificador orgânico, tanto em escala analítica como preparativa.

As fases do tipo RAM-BSA preparadas mostraram eficiente desempenho na exclusão das proteínas do plasma bovino, excluindo na média 96% das proteínas presentes no plasma. As colunas RAM usadas mostraram ser robustas e eficientes para serem usadas como colunas extratoras para os metabólitos do albendazol.

A Cromatografia Multidimensional é uma técnica que permite a análise de amostras com alto grau de complexidade. O emprego dessa técnica possibilitou o desenvolvimento do método de análise simultânea dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido, do albendazol-sulfona e para o albendazol-amino-sulfona em plasma bovino, com injeção direta de amostras, a qual permitiu uma grande

---

---

redução no tempo total de análise, totalizando 35 minutos para os quatro compostos estudados.

O método desenvolvido mostrou ser prático, linear, exato, preciso, seletivo, sensível e robusto utilizando-se a injeção direta de plasma bovino e podendo ser utilizado para estudos farmacocinéticos enantiosseletivos.

*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, G. S. B. "Albendazol". Brasília, Universidade de Brasília, 2005. Monografia de Farmacologia, 16 p.
2. RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. "Fármacos Anti-Helmínticos". IN: *Farmacologia*, 4º ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 622-626.
3. CARVALHO, D. A.; SATHLER, I. & ROSADO, M. "Cisticercose Bovina - Saiba o que é e como evitá-la". Disponível em: <http://www.sna.agr.br/artigos/artitec-bovinos02.htm> Acesso em 11/06/2007.
4. [www.geocities.com/maquaticos/platelmintos.htm&h=539&w=530&sz=37&hl=pt-BR&start=6&tbnid=FcXdVHOZ2qlioM:&tbnh](http://www.geocities.com/maquaticos/platelmintos.htm&h=539&w=530&sz=37&hl=pt-BR&start=6&tbnid=FcXdVHOZ2qlioM:&tbnh). Acesso em 02/07/2007.
5. Conselho Regional de Medicina Veterinária. "Verminoses dos Bovinos". Disponível em: [http://crmvp-pr.com.br/index2.php?option=com\\_content&task=view&id=112&Ite](http://crmvp-pr.com.br/index2.php?option=com_content&task=view&id=112&Ite). Acesso em 11/06/2007.
6. REPOSSI JUNIOR, P. F.; BARCELLOS, M. P.; TRIVILIN, L. O.; MARTINS, I. V. F. & SILDA, P. C. A. R. "Prevalência e Controle das Parasitoses Gastrointestinais em Bezerros de Propriedades Leiteiras no Município de Alegre, Espírito Santo". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **15** (4): 147-150, 2006.
7. "Pecuária de Corte". Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?prt=true&qact=view&notid=7319>. Acesso em 11/06/2007.
8. VIDOTTO, O. "Principais Parasitas que Afetam os Bovinos e Estratégias de Controle (Parte II)". Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1112> Acesso em 11/06/2007.
9. MORENO, L.; ECHEVARRIA, F.; MUÑOZ, ALVAREZ, L.; BRUNI, S. S. & LANUSSE, C. "Dose-Dependent Activity of Albendazole Against Benzimidazole-Resistant Nematodes in Sheep: Relationship between Pharmacokinetics and Efficacy." *Experimental Parasitology*, **106**: 150-157, 2004.
10. LOUKAS, A. & HOTEZ P. J. "Quimioterapia das Infecções por Helmintos". IN: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 963-981.
11. "Anti-Helmínticos Anti-Colinesterásicos". Disponível em: <http://www.medvet.hpg.ig.com.br/farmacocache.html> Acesso em 11/06/2007.

12. MALACCO, M. A. F. "Controle Parasitário da Fêmea Bovina". Disponível em [http://br.merial.com/rage/artigos\\_tecnicos/Cont\\_par\\_fem\\_bovina.pdf](http://br.merial.com/rage/artigos_tecnicos/Cont_par_fem_bovina.pdf) Acesso em 11/06/2007.
13. BIACHIN, I.; HONER, M R.; NUNES, S. G.; NASCIMENTO, Y. A.; CURRO, J. B. E. & COSTA, F. P. "Epidemiologia dos Nematóides Gastrointestinais em Bovinos de Corte nos Cerrados e o Controle Estratégico no Brasil". *Circular Técnica - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte*, **24**, 1996.
14. BORGES, C. C. "Atividade In Vitro de Anti-Helmínticos sobre Larvas Infectantes de Nematóides Gastrointestinais de Caprinos, Utilizando a Técnica de Coprocultura Quantitativa" *Parasitologia Latinoamericana*, **58**: 142-147, 2003.
15. DANAHER, M.; RUYCK, H. D.; CROOKS, S. R. H.; DOWLING, G. & O'KEEFFE, M. "Review of Methodology for the Determination of Bezimiazole Residues in Biological Matrices". *Journal of Chromatography B*, **845**: 1-37, 2007.
16. DAYAN, A. D. "Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics". *Acta Tropica* **86**: 141-159, 2003.
17. BATZIAS, C. G. & DELIS, G. A. "Reversed- Phase Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Simultaneous Determination of Albendazole Sulfoxide, Albendazole -Sulphone e Albendazole-2-Amino Sulphone in Sheep Plasma". *Journal of Chromatography B*, **805**: 267-274, 2004.
18. FORMENTINI, E. A.; MESTORINO, O. N.; MARIÑO E. L. & ERRECALDE, J. O. "Pharmacokinetics of Ricobendazole in Calves". *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **24**: 199-202, 2001
19. LANCHOTE, V. L.; MARQUES, M. P. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; CARVALHO, R. PAIAS, F. O. & BONATO, P. S. "Simultaneous Determination of Albendazole Sulfoxide Enantiomers and Albendazole Sulfone in Plasma", *Journal of Chromatography B*, **709**: 273-279, 1998.
20. KITZMAN, D.; CHENG, K. J. & FLECKENSTEIN, L. "HPLC Assay for Albendazole and Metabolites in Human Plasma for Clinical Pharmacokinetic Studies" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**: 801-813, 2002.
21. SOTELO, J. & JUNG, H.. "Pharmacokinetic Optimisation of the Treatment of Neurocysticercosis". *Clinical Pharmacokinetics*, **35** (6): 503-515, 1998.
22. GARCIA, J. J.; FÉRNANDEZ, F. B. & TORRADO, J. J. Quantitative "Determination of Albendazole and its Main Metabolites in Plasma". *Journal of Chromatography B*, **723**: 265-271, 1999.
23. WU, Z.; MEDLICOTT, N. J.; RAZZAK, M. & TUCKER, I. G. "Development and Optimization of Rapid HPLC Method for Analysis of Ricobendazole and

- Albendazole Sulfone in Sheep Plasma". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**: 225-232, 2005.
24. CRISTOFOL, C.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; ARBOIX, M. & LANUSSE, C. "Albendazole Sulphoxide Enantiomeric Ratios in Plasma and Target Tissues after Intravenous Administration of Ricobendazole to Cattle." *Journal of Veterinary Pharmacological Therapeutics*, **24**: 117-124, 2001.
25. BONATO, P. S & JABOR, V. A. R. "Análise Enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar", *Química Nova*, **28** (4): 683-691, 2005.
26. BONATO, P. S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C.; PAIAS, F. O.; IHA, M. H. & LIMA, R. P. "Enantiomeric Resolution of Drug and Metabolites in Polysaccharide and Protein Based Chiral Stationary Phase" *Journal of Brazilian Chemistry Society*, **2** (13): 190-199, 2002.
27. CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G.; Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação; São Carlos, EdUFSCar, 1º. Ed, 77p., 2002.
28. WATANABE, C. S. F. "Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência para o Controle de Qualidade de Fármacos Anti-Retrovirais". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 129 p.
29. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. "Cromatografia Líquida de Alta Eficiência". IN: *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, Ed. da Unicamp, 2006, p. 273-398.
30. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J.L. "Practical HPLC Method Development", New York, John Wiley and Sons Inc., 2ª ed., 765 p., 1997.
31. MAIER, N. M.; FRANCO, P. & LINDNER, W. "Separation of Enantiomers: Needs, Challenges, Perspectives", *Journal of Chromatography A*, **906**: 3-33, 2001.
32. BOJARSKI, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y. & GHANEM, A. "What's New in Chromatographic Enantioseparations", *Analytical Chemistry*, **1**: 59-77, 2005.
33. BERTHOD, A. "Chiral Recognition Mechanisms", *Analytical Chemistry*, abril: 2093-2099, 2006.
34. COIMBRA, M. "Determinação do Coeficiente Cromatográfico de Partição,  $K_w$ , de Inibidores da Bomba de Prótons." São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 140 p.
35. WAINER, I. W. "HPLC Chiral Stationary Phases for the Stereochemical Resolution of Enantiomeric Compound. The Current State of the Art" IN: *Drug Stereochemistry Analytical Methods and Pharmacology*, New York, Marcel Dekker Inc, 2ª. Ed., p. 139-182, 1993.



36. YASHIMA, E.: "Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography Enantioseparation" *Journal of Chromatography A*, **906**: 105-125, 2001
37. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y. "Resolution by High-Performance Liquid Chromatography Using Polysaccharide Carbamates and Benzoates as Chiral Stationary Phases". *Journal of Chromatography A*, **666**: 403-419, 1994.
38. TIRITAN, M. E. "Resolução Enantiomérica de Sulfóxidos Quirais por CLAE, em carbamatos de Polissacarídeos". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 1996. Tese de Doutorado, 135 p.
39. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; TIRITAN, M. E.; MATLIN, S. A. CURRAN, D. P. & BALOG, A. Enantiomeric Resolution by HPLC of Axial Chiral Amides Using Amylose tris[(S)-1-phenylethylcarbamate]". *Chirality*, **8**: 143-146, 1996.
40. HESSE, G. & HAGEL, R. "Eine Volständige Racemattrennung Durch Elutions Chromatografie na Cellulose-Tri-Acetat"; *Chromatography*, **6**: 277-280, 1973.
41. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; YAMAMOTO, K. & HATADA, K. "Useful Chiral Packing Materials for High Performance Liquid Chromatographic Resolution. Cellulose Triacetate and Tribenzoate Coated on Macroporus Silica Gel" *Chemistry Letters*, 739-742, 1984.
42. OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; FUKUMOTO, T. & HATADA, K. "Useful Chiral Packing Stationary Phases for HPLC. Amylose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate and Tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) Supported on Silica Gel" *Chemistry Letters*, 1857-1860, 1987.
43. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; ABURATANI, R.; HATADA, K.; NISHIYAMA, T. & MASUDA, M. "Optical Resolution of  $\beta$ -Blockeres by HPLC on Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives" *Chemistry Letters*, 1237-1240, 1986.
44. OKAMOTO, Y. & YASHIMA, E. "Chiral Discrimination on polysaccharides Derivatives", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **68**: 3289-3307, 1995.
45. OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y.; HAYASHIDA, H. & HATADA, K. "Tris 1-phenylethylcarbamate) of Cellulose and amylose as Useful Chiral Stationary Phases for Chromatographic Optical Resolution" *Chemistry Letters*, 909-912, 1990.
46. MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M. & HEYDEN, Y. V. "Screening Approach for Chiral Separation of Phamaceuticals IV. Polar Organic Solvent Chromatography". *Journal of Chromatography A*, **1111**: 48-61, 2006.
47. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. & CASSIANO, N. M. "The Use of a Polysaccharide Based Column on Multimodal Elution." *Journal of Liquid Chromatography & Related Techonologies*, **23** (13): 1029-1038, 2000.

48. ALI, I. & ABOUL-ENEIN, H. Y. "Impact of Immobilized Polysaccharide Chiral Stationary Phases on Enantiomeric Separations", *Journal Sep. Sci.*, **29**: 762-769, 2006.
49. LIPKA-BELLOLI, E.; LEN, C.; MACKENZIE, G.; RONCO, G.; BONTE, J. P. & VACCHER, C. "Diastereomeric Resolution of Nucleoside Analogues, New Potential Antiviral Agents, Using High-Performance Liquid Chromatography on Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phases", *Journal of Chromatography A*, **943**: 91-100, 2001.
50. CASS, Q. B. & OLIVEIRA, R. V., "Separations of Multi-Miligram Quantities of Gossipol Enantiomers on Polysaccharide-Based Stationary Phases", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **25** (5): 819-829, 2002.
51. SOUZA, M. E.; TIRITAN, M. E.; BELAZ, K. R. A.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; CASS, Q. B. & PINTO, M. M. M. "Multimilligram Enantioresolution of Low-Solubility Xanthonolignoids on Polysaccharide Chiral Stationary Phases Using a Solid-Phase Injection System". *Journal of Chromatography A*, **1120**: 75-81, 2006.
52. LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M. & CASS, Q. B. "Desenvolvimento de Colunas Cromatográficas de Meios de Acesso Restrito Proteína-Imobilizada e suas Avaliações para Análise de Fármacos com Injeção Direta de Plasma Humano" *Química Nova* **29** (1): 72-78, 2006.
53. 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" *Química Nova*, **24** (1): 68-76, 2001.
54. ANDERSON, J. A. "High Performance Liquid Chromatography (Direct Injection Techniques)". *Analytical Chemistry*, **65** (12): 434-443, 1993.
55. SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L. "Restricted Access Materials and Large Particle Supports for On-Line Sample Preparation: an Attractive Approach for Biological Fluids Analysis" *Journal of Chromatography B*, **801**: 141-156, 2004.
56. MOURE, F.; RENDUELES, M. & DIAZ, M. "Bovine Plasma Protein Fractionation by Ion Exchange Chromatography". *Bioprocess Biosyst Eng*, **27**: 17-24, 2004.
57. HENNION, M. C. "Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography" *Journal of Chromatography A*, **856**: 3-54, 1999.
58. BARKER, S. A. "Matrix Solid-Phase Dispersion" *Journal of Chromatography A*, **885**: 115-127, 2000.
59. MULLETT, W. M. "Determination of Drugs in Biological Fluids by Direct Injection of Sample for Liquid-Chromatographic Analysis" *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**: 263-273, 2007.

60. QUINN, H. M. & TAKAREWSKI, J. J. "High Performance Liquid Chromatography Methods and Apparatus" *PCT Int. Appl. WO 9716724*, 1997, p. 46.
61. BOOS, K. S. & RUDOLPHI, A. "The Use of Restricted-Access Media in HPLC, part I-Classification and Review" *LC-GC*, **15** (7):602-611, 1997.
62. HAGINAKA, J. "Drug Determination in Serum by Liquid Chromatography with Restricted Access Stationary Phases" *Trends in Analytical Chemistry*, **10** (1): 17-22, 1991.
63. LIMA, V. V. Colunas RAM e Biorreatores de GAPDH: Desenvolvimento, Avaliação e Aplicação em CLAE. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 173 p.
64. GISCH, D.J.; HUNTER, B.T. & FEIBUSH, B. "Shielded Hydrophobic Phase: A New Concept for Direct Injection Analysis of Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography*, **433**: 264-268, 1988.
65. HAGINAKA, J.; WAKAI, J. & YASUDA, H. "Synthesis of Mixed-Functional-Phase Silica Supports for Liquid Chromatography and their Applications to Assays of Drugs in Serum". *Journal of Chromatography*, **535**: 163-172, 1990.
66. HAGINAKA, J. & WAKAI, J. "Preparation and Characterization of Mixed Functional Phase Silica Materials Using Phenyl-, Butyl- or Octylchlorosilane as a Silylating Agent". *Journal of Chromatography*, **596**: 151-156, 1992.
67. HAGESTAM, H. & PINKERTON, T. C. "Internal Surface Reversed-Phase Silica Supports for Liquid Chromatography", *Analytical Chemistry*, **57** (8): 1757-1763, 1985.
68. BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A. & LUBDA, D. "Alkyl-diol silica (ADS): Restrired Access Precolumn Packings for Direct Injection and Coupled-Column Chromatography of Biofluids". *Journal of Analytical Chemistry*, **352**: 684-690, 1995.
69. DESILETS, C. P.; ROUNDS. M.A. & REGNIER, F. E. "Semipermeable-Surface Reversed-Phase Media for High-Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography*, **544**: 25-39, 1991.
70. GLUNZ, I.J.; PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J.; Rateike, J.D. & Glunz, P.W. "The Semipermeable Surface, A New Restricted Access Medium" *Journal of Chromatography*, **15**: 1361-1379, 1992.
71. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N. & IMAI, H. "Some Characteristics of a Protein-Coated ODS Column and its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection Analysis of Plasma Samples". *Chromatographia*, **19**: 466-472, 1984.

72. MENEZES, M. L. & FELIX, G. "Analysis of Organochlorine Pesticides in Plain Milk Using Direct Injection on a ISRP Column with Column Switching". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **19**: 3221-3228, 1996.
73. MENEZES, M. L. & FELIX, G. "On-Line Extraction and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **21**: 2863-2871, 1998.
74. MENEZES, M. L.; FELIX, G. & DEMARCHI, A. C. O. "On-Line Extraction and Determination of Carbofuran in Raw Milk by Direct HPLC Injection on ISRP Column". *Chromatographia*, **47**: 81-83, 1998.
75. ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y. & SATO, T. "Avidin Protein-Conjugated Column for Direct Injection Analysis of Drug Enantiomers in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography*, **572**: 133-141, 1991.
76. FELIX, G. & CAMPÈSE, D. "Determination by HPLC of the Chiral Conversion of Drugs in Biologic Fluids on New RAM-CHIRAL Columns" *30<sup>th</sup> International Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*. San Francisco-CA-USA, 2006, p. 170.
77. PAIAS, F. O.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, M. O. & BONATO, P. S. "Enantioselective analysis of Albendazole Sulfoxide in Plasma Using the Chiral Stationary Phase". *Chirality*, **9**: 722-726, 1997.
78. FLETOURIS, D. J.; BOTSOGLOU, N. A.; PSOMAS, I. E. & MANTIS, A. I. "Determination of the Marker Residue of Albendazole in Milk Using Ion-Pair Liquid Chromatography and Fluorescence Detection." *Analytica Chimica Acta*, **345**: 111-119, 1997.
79. SOLANA, H. D.; RODRIGUEZ, J. A. & LANUSSE, C. E. "Comparative Metabolism of Albendazole and Albendazole Sulphoxide by Different Helminth Parasites." *Parasitological Research*, **87**: 275-280, 2001.
80. MARQUES, M. P.; TAKAYANAGUI, O. M. & LANCHOTE, V. L. "Albendazole Metabolism in Patients with Neurocysticercosis: Antipyrine as a Multifunctional Marker Drug of Cytochrome P450." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **35**: 261-269, 2002.
81. MIRFAZAEIAN, A.; DADASHZADEH, S. & ROUINI, M. R. "A High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Albendazole Metabolites in Human Serum." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**: 1249-1254, 2002.
82. SHAIK, B.; RUMMEL, N.; GIESEKER, C.; SERFLING, S. & REIMSCHUESSEL, R. "Metabolism and Residue Depletion of Albendazole and its Metabolites in Rainbow Trout, Tilapia, and Atlantic Salmon after

- Oral Administration." *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, **26**: 421-427, 2003.
83. SHAIK, B.; RUMMEL, N. & REIMSCHUESSEL, R. "Determination of Albendazole and its Major Metabolites in the Muscle Tissues of Atlantic Salmon, Tilapia and Rainbow Trout by High liquid Chromatography with Fluorometric Detection." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3254-3259, 2003.
84. BATZIAS, G. C.; THEODOSIADOU, E. & DELIS, G. A. "Quantitative Determination of Albendazole Metabolites in Sheep Spermatozoa and Seminal Plasma by Liquid Chromatographic Analysis with Fluorescence Detection." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 1191-1202, 2004.
85. FLETOURIS, D. J.; PAPAPANAGIOTOU, E. P.; NAKOS, D. S. & PSOMAS, I. E. "Highly Sensitive Ion Pair liquid Chromatographic Determination of Albendazole Marker Residue in Animal Tissues." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 893-898, 2005.
86. DOWLING, G.; CANTWELL, H.; KEEFFE, M. & SMYTH, M. "Multi-Residue Method for the Determination of Benzimidazoles in Bovine Liver." *Analytica Chimica Acta*, **529**: 285-292, 2005.
87. GOKBULUT, C.; AKAR, F. & MCKELLAR, Q. A. "Plasma Disposition and Faecal Excretion of Oxfendazole, Fenbendazole, and Albendazole Following Oral Administration to Donkeys." *The Veterinary Journal*, **172**: 166-172, 2006.
88. BRADFORD, M.M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254, 1976
89. CLAYDEN, J. GREEVES, N. & WOTHERS, P. "Organo-Main-Group Chemistry 1: Sulfur." IN: Organic Chemistry. Nova Iorque, Oxford University Press, 2001, p. 1247-1272.
90. ALI, M. H. & BOHNERT, G. J. "A Facile Procedure for Oxidation of Sulfides to Sulfoxides with Molecular Bromine on Hydrated Silica Gel in Dichloromethane." *Synthesis*, 1238-1241, 1998.
91. KACZOROWSKA, K.; KOLARSKA, Z.; MITKA, K. & KOWALSKI, P. "Oxidation of Sulfides to Sulfoxides. Part 2: Oxidation by Hydrogen Peroxide." *Tetrahedron*, **61**: 8315-8327, 2005.
92. OTERA, J. & SATO, T. "Oxidation of Aryl Sulfides to the Sulfoxides." *Synlett*, 365-370, 1995.
93. TAJBAKHSH, M.; LAKOURAJ, M.; YADOLLAHZADEH, K.; SHAKERI, A. R. & KHALILZADEH, M. A. "Conversion of Sulfides to Sulfoxides and Thiols to Disulfides with o-Xylylenebis(Triphenylphosphonium Tribromide)". *Journal of Chemical Research*, 796-799, 2005.

94. BATIGALHIA, F., HERANDES, M. Z., FERREIRA, A. G., MALVESTITI, I., CASS, Q. B. "Selective and Mild Oxidation of Sulfides to Sulfoxides by Oxodiperoxo Molybdenum Complexes Adsorbed Onto Sílica Gel". *Tetrahedron*, **57**: 9669-9676, 2001.
95. MIMOUN, H.; ROCH, I. S. & SAJUS, L. "Nouveaux Complexes Peroxydiques Covalents du Molibdène et du Tungstène avec les bases Organiques." *Bulletin de La Société Chimique de France*, **5**: 1481-1492, 1969.
96. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M. & KRIZ, G. S. "Introduction to Spectroscopy." Washington, Saunders College Publishing, 2<sup>a</sup>. Ed., 511 p.
97. SOCRATES, G. "Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts," Inglaterra, John Wiley & Sons, 2<sup>a</sup>. Ed, 1994.
98. SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos" Rio de Janeiro, LTC, 6<sup>a</sup>. Ed., 460 p.
99. PODÁNYI, B., MORVAI, M. "Carbon-Proton coupling constants in aromatic and alicyclic compounds". *Bulletin of Magnetic Resonance*, **18**, 143-144
100. CASSIANO, N. M., LIMA, V. V., OLIVEIRA, R. V., DE PIETRO, A. C. & CASS, Q. B. "Development of Restricted-Access Media Supports and their Application to the Direct Analysis of Biological Fluid Samples Via High-Performance Liquid Chromatography" *Anal. Bioanal. Chem.* **384**: 1462-1469, 2006.
101. CASS, Q. B.; GOMES, R. F.; CALAFATTI, S. A. & PEDRAZOLLI Jr, J. "Determination of Amoxicillin in Human Plasma by Direct Injection and Coupled-Column High-Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography A*, **987**: 235-241, 2003.
102. CASSIANO, M. M.; CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. & WAINER, I. W. "Determination of Plasma Levels of Metirapone and its Enantiomeric Metirapol Metabolites by Direct Plasma Injection and Multidimensional Achiral-Chiral Chromatography" *Chirality*, **14**: 731-735, 2002.
103. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M. & PEDRAZOLLI Jr, J. "Enantiomeric Determination of Pantoprazole in Human Plasma by Multidimensional High-Performance Liquid Chromatography" *Journal of Chromatography B*, **766**: 153-160, 2002.
104. CASS, Q. B.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; & PEDRAZOLLI Jr, J. "Enantiomeric Determination of the plasma levels of Omeprazole by Direct Plasma Injection Using High-Performance Liquid Chromatography with Achiral-Chiral Column-Switching" *Journal of Chromatography B*, **798**: 275-281, 2003.
105. PEREIRA, A. V., CASS, Q. B. "High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Bovine Milk Using an On-Line Cleanup Column" *J. Chromatogr. B*, **826**, 139-146, 2005.

106. OLIVEIRA, R. V., DE PIETRO, A. C., CASS, Q. B. "Quantification of Cephalexin as Residue Levels in Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography with On-Line Sample Cleanup" *Talanta*, **71** (3): 1233-1238, 2007.
107. OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. "Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporin Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanup of Bovine Milk." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 1180-1187, 2006
108. DE PAULA, F. C. C. R. "Desenvolvimento de um Método para Quantificação Simultânea de Sulfametoxazol e Trimetoprima em Ovos de Galinha Utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Bidimensional". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 116 p.
109. CASS, Q. B. & GALATTI, T. F. "A Method for Determination of the Plasma Levels of Modafinil Enantiomers, ( $\pm$ )-modafinilic acid and Modafinil Sulphone by Direct Human Plasma Injection and Bidimensional Achiral-Chiral Chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **XXX**: **XXX**, 2007.
110. YU, Z.; WESTERLUND, D. & BOOS, K. "Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Restricted-Access Media Precolumns in the Course of Direct Injection of Large Volumes of Plasma Samples in Column-Switching Systems". *Journal of Chromatography B*, **704**: 53-62, 1997.
111. OLIVEIRA, R. V. "Métodos para a Análise de Antibióticos Cefalosporínicos em Leite Bovino, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Multidimensional, com Injeção Direta de Amostras." São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 195 p.
112. OKAMATO, Y. KAIDA, E. Chiral Discrimination on Polysaccharides Derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **68**, 3289-3307, 1995.
113. GRIEB, S. J.; MATLIN, S. A.; BELENGUER, A. M. & RITCHIE, H. J. Chiral HPLC with Cellulose Carbamate Coated Phases: Influence of Support Surface Chemistry on Enantioselectivity." *Chirality*, **6**: 129-134, 1994.
114. CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A. & DEGANI, A. L. G. "Discriminação Quiral por CLAE em Carbamatos de Polissacarídeos: Desenvolvimento, Aplicações e Perspectivas". *Química Nova*, **20** (1): 49-57, 1997.
115. CASS, Q. B. & BATIGALHIA, F. "Enantiomeric Resolution of a Series of Chiral Sulfoxides by High-Performance Liquid Chromatography on Polysaccharide-Based Columns with Multimodal Elution". *Journal of Chromatography A*, **987**, 445-452, 2003.

116. MONTANARI, C. A.; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E. & SOUZA, A. L. S. "A QSERR Study on Enantioselective Separation of Enantiomeric Sulphoxides". *Analytica Chimica Acta*, **419**: 93-100, 2000.
117. CLANKVETADZE, B.; YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y. "Enantioseparation of Selected Chiral Sulfoxides Using Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phases and Polar Organic, Polar-Aqueous-Organic and Normal-Phase Eluents". *Journal of Chromatography A*, **922**: 127-137, 2001.
118. MATLIN, S. A., TIRITAN, M. E.; CASS, Q. B. & BOYD, D. R. "Enantiomeric Resolution of Chiral Sulfoxides on Polysaccharide phases by HPLC". *Chirality*, **8**: 147-152, 1996.
119. MATLIN, S. A.; TIRITAN, M. E.; CRAWFORD, A. J.; CASS, Q. B. & BOYD, D. R. "HPLC with Carbohydrate Carbamate Chiral Phases: Influence of Chiral phase Structure on Eanantioselectivity". *Chirality*, **6**: 135-140, 1994.
120. OKAMOTO, Y; KAWASHIMA, M; HATADA, K. "Controlled Chiral Recognition of Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives Supported on Silica Gel". *Journal of Chromatography*, **363**: 173,1986.
121. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Veterinary Medicine, 2001, 22 p. Disponível em : <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf>. Acesso em 25/01/2007
122. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm) Acesso em 25/01/2007
123. MILLER, L.; ORIHUELA, C. FRONEK, R. HONDA, D. & DAPREMONT, O. "Chromatographic Resolution od the Enantiomers of a Pharmaceutical Intermediate from the Miligram to the Kilogram Scale". *Journal of Chromatography A*, **849** (2): 309-317, 1999.
124. FRANCOTTE, E. R. Enantioselective Chromatography as a powerful Alternative for the Preparation of Drug Enantiomers. *Journal of Chromatography A*, **906**: 379-397, 2001.
125. ZONGDE, Z.; XINGPING, L.; XIAOMEI, W.; HONG, Z.; YANPING, S.; LIREN, C. & YONGMIN, L. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **62**: 69-79, 2005.