

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO DA TAFENOQUINA EM
AMOSTRAS DE PLASMA HUMANO

AMANDA MAMED DE GUSMÃO LOBO

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AMANDA MAMED DE GUSMÃO LOBO

EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
NA DETERMINAÇÃO DA TAFENOQUINA EM AMOSTRAS DE PLASMA
HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães

MANAUS

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L799e Lobo, Amanda Mamed de Gusmão
Emprego da microextração líquido-líquido dispersiva na
determinação da tafenoquina em amostras de plasma humano /
Amanda Mamed de Gusmão Lobo. 2015
63 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Igor Rafael dos Santos Magalhães
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. tafenoquina. 2. validação. 3. microextração. 4. plasma. I.
Magalhães, Igor Rafael dos Santos II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

AMANDA MAMED DE GUSMÃO LOBO

EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
NA DETERMINAÇÃO DA TAFENOQUINA EM AMOSTRAS DE PLASMA
HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 21 de dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr.º Igor Rafael dos Santos Magalhães. Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof.º Dr.º Márcio Luis Lombardi Martinez. Membro
Universidade Estadual do Amazonas

Prof.ª Dr.ª Ana Cyra dos Santos Lucas. Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Anete Mamed (*in memoriam*), que esteve comigo até o último dia dos ensaios, por todo o amor dedicado a mim e por sempre acreditar e torcer pelas minhas conquistas;

Ao meu irmão, Arlindo Neto, uma das minhas grandes motivações na busca dos meus objetivos;

Ao meu pai, João David de Gusmão Lobo, e minha avó, Zuleika Lobo, por também me incentivarem e me apoiarem em toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães, pela oportunidade, confiança e ensinamentos que tanto contribuíram para meu crescimento científico;

Às amigas do Núcleo de Estudos de Farmacocinética - NePK, Edna Márcia e Nayana Yared, pelos inúmeros momentos de apoio, ajuda e incentivo para a realização deste trabalho;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

RESUMO

A Tafenoquina (TQ) corresponde a uma 8-aminoquinolina sintética e análoga da primaquina, que está em testes de fase III para o tratamento da malária humana. Apresenta melhor atividade antimalárica em relação ao congênere *in vitro* e é geralmente bem tolerada nos pacientes. Existem alguns métodos para quantificar a TQ em plasma humano, porém nenhum utiliza a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), método que apresenta as seguintes vantagens: miniaturização, baixo custo, alta eficiência de extração e pré-concentração e elevado potencial para aplicação de rotina. O objetivo deste estudo foi avaliar o emprego da microextração líquido-líquido dispersiva para a determinação da tafenoquina em plasma humano. Após a precipitação de proteínas, TQ foi extraída do plasma por DLLME utilizando clorofórmio e acetonitrila como solvente extrator e dispersor, respectivamente. A fase móvel consistiu em metanol/acetonitrila/acetato de sódio (10 mmol L⁻¹, pH 6,7, 25°C)/ácido acético (50:30:20:0,1 v/v/v) em conjunto com uma coluna C18 (15 x 4,6 mm, 5µm). O comprimento de onda utilizado foi 262 nm com vazão de 1mL/min. Os seguintes fatores que influenciam a eficiência de extração foram avaliados e otimizados: solvente dispersor, solvente extrator, volume de solvente extrator, pH e tempo de extração. Durante a otimização, clorofórmio e acetonitrila apresentaram maior recuperação como solvente extrator e dispersor, respectivamente. Para volume de solvente extrator, obteve-se melhor resultado adicionando-se 1 mL de uma solução contendo 30% de solvente extrator. Na avaliação do pH, maior extração foi observada adicionando-se 100 µL de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ na amostra. Por fim, o tempo de extração de 2 min foi o que apresentou maior recuperação. Com o método otimizado, a recuperação observada foi 78,3% e o limite inferior de quantificação foi 50 ng mL⁻¹. O método foi linear no intervalo de 50 a 1500 ng mL⁻¹ (r² = 0,99) com precisão e exatidão satisfatórias e, portanto, pode ser útil em análises de rotina, especialmente pela simplicidade da técnica, rapidez e baixo uso de solvente, características apresentadas pela técnica de DLLME.

Palavras-chaves: tafenoquina, validação, microextração, plasma

ABSTRACT

Tafenoquine (TQ) is an 8-aminoquinolone, synthetic analogue of primaquine which is in phase III tests for the treatment of human malaria. It shows better antimalarial activity than primaquine *in vitro* and is usually well tolerated in patients. There are some methods for TQ quantification in human plasma, but none uses Dispersive-Liquid-Liquid Microextraction (DLLME), an extraction technique that shows as main advantages: miniaturization, low cost, high efficiency of extraction and pre-concentration and high potential for routine application. The aim of this study was to evaluate the use of DLLME to determine tafenoquine in human plasma. After protein precipitation, TQ was extracted from plasma by DLLME using chloroform and acetonitrile as extraction solvents and dispersants, respectively. The mobile phase consisted of methanol/acetonitrile/sodium acetate (10 mmol L⁻¹, pH 6.7, 25°C)/acetic acid (50:30:20:0.1 v/v/v) and a C18 column (15 x 4.6mm, 5µm) was used. The UV detection was performed at 262 nm and 1 mL/min as flow rate. The following factors that influence extraction efficiency were evaluated and optimized: dispersing solvent, solvent extractor, extractor solvent volume, pH and extraction time. During optimization, chloroform and acetonitrile showed higher recovery as an extractor and dispersant solvent, respectively. For evaluation of solvent extractor volume, the best result was obtained by adding 1 mL of a solution containing 30% of solvent extractor. For pH evaluation, greater extraction was observed by adding 100 µL of 0.5 mol L⁻¹ NaOH solution in the sample. Finally, 2 min was the greater recovery extraction time. After optimized conditions, the method recovery was 78,3% and the lower limit of quantification was 50 ng mL⁻¹. This method was considered linear over the range 50-1500 ng mL⁻¹ ($r^2 = 0,99$), with satisfactory accuracy and precision, and also may be useful in routine analyses specially because of the simplicity of this technique, rapidity and low use of solvents, presented features by DLLME technique.

Keywords: tafenoquine, validation, microextraction, plasma.

ABREVIATURAS E SIGLAS

PQ	Primaquina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MLLD	Microextração Líquido-líquido Dispersiva
DLLME	<i>Dispersive Liquid-liquid Microextraction</i>
ACN	Acetonitrila
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
TR	Tempo de Retenção
TQ	Tafenoquina
VL	Volume de Injeção
PI	Padrão Interno
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Vol.	Volume
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 MALÁRIA NO BRASIL E NO MUNDO	13
2.2 DERIVADOS 8-AMINOQUINOLÍNICOS	14
2.2.1 Tafenoquina	15
2.2.1.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas da tafenoquina	15
2.2.1.2 Farmacologia da TQ	17
2.2.1.3 Métodos desenvolvidos para quantificação de TQ em amostras biológicas	18
2.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION – DLLME)	20
2.3.1 Fundamentação teórica	21
2.3.2 Fatores que afetam a DLLME	22
2.3.2.1 Tipo e volume dos solventes extrator e dispersor	22
2.3.2.2 Tempo de extração	23
2.3.2.3 pH	23
2.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE ORIGEM BIOLÓGICA	23
2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	24
2.5.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos	26
2.5.1.1 Seletividade	26
2.5.1.2 Linearidade	27
2.5.1.3 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	28
2.5.1.4 Exatidão	29
2.5.1.5 Precisão	30
2.5.1.6 Recuperação	31
2.5.1.7 Estudos de estabilidade	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 GERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAIS	36
4.1.1 Reagentes e solventes	36
4.1.2 Equipamentos	36
4.1.2.1 Sistema cromatográfico	36
4.1.2.2 Coluna cromatográfica	37
4.1.2.3 Outros equipamentos e materiais utilizados	37
4.1.3 Soluções padrão	37
4.1.4 Amostras de plasma	38
4.2 MÉTODOS	38
4.2.1 Procedimento de preparação das amostras	38
4.2.1.1 Precipitação das proteínas	39
4.2.2 Extração utilizando a técnica de Microextração líquido-líquido dispersiva (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME)	39

4.2.3	Análise cromatográfica.....	39
4.2.4	Otimização	41
4.2.5	Validação do método desenvolvido	42
4.2.5.1	Seletividade.....	42
4.2.5.2	Linearidade.....	42
4.2.5.3	Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	43
4.2.5.4	Precisão e exatidão	43
4.2.5.5	Recuperação.....	43
4.2.5.6	Estabilidade.....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE VARREDURA NO ULTRAVIOLETA.....	45
5.2	DEFINIÇÃO DA FASE MÓVEL	45
5.3	PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
5.3.1	Otimização do sistema DLLME.....	48
5.3.1.1	Solvente extrator.....	48
5.3.1.2	Solvente dispersor	50
5.3.1.3	Volume de solvente extrator	51
5.3.1.4	pH	52
5.3.1.5	Tempo de extração	53
5.3.2	Validação	54
5.3.2.1	Seletividade.....	54
5.3.2.2	Linearidade.....	55
5.3.2.3	Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	56
5.3.2.4	Precisão e exatidão	58
5.3.2.5	Recuperação.....	58
5.3.2.6	Estabilidade.....	59
6.	CONCLUSÕES	60
7.	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

A malária continua sendo um importante problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais, sendo ainda causa de mortes em todo o mundo (OMS, 2014). Atualmente, os fármacos utilizados na terapia antimalárica são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40, e a terapia antimalárica é feita geralmente através da combinação de 2 ou mais fármacos. Devido a vários fatores que envolvem desde efeitos tóxicos, efeitos adversos indesejáveis e resistência do *Plasmodium* à terapia antimalárica atual, pesquisas de novos agentes vêm sendo realizadas a fim de melhorar a terapêutica existente.

A TQ, identificada em 1978, surgiu como uma nova alternativa para a terapêutica. Esse fármaco pertence ao grupo das 8-aminoquinolinas, tem origem sintética e derivada da primaquina, que já está em uso há várias décadas. Esforços foram feitos com o objetivo de encontrar uma substância que apresentasse eficácia próxima à da primaquina e que apresentasse menos efeitos adversos e tóxicos, como desconfortos gastrintestinais e hemólise em indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase.

Atualmente, a TQ está em testes de fase III para o tratamento da malária. Os testes em humanos necessitam de quantificação em plasma para que o acompanhamento das respostas dos indivíduos seja feito de maneira adequada. Além disso, métodos bioanalíticos podem contribuir significativamente para estudos de biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e toxicocinética, especialmente importantes quando se trata de fármacos em fase de testes.

Existem hoje alguns métodos validados para quantificação de TQ em plasma humano, porém, em nenhum foi observado o uso de Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-liquid Microextraction*), técnica que apresenta inúmeras

vantagens, dentre elas o baixo custo, rapidez, baixo uso de solventes orgânicos e miniaturização.

O presente trabalho vem apresentar um método desenvolvido com o objetivo de quantificar a TQ em plasma humano, utilizando a técnica DLLME no preparo de amostras. Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos a partir dele, o método foi também validado através da verificação de alguns parâmetros como linearidade, seletividade, exatidão, precisão e estabilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Malária no Brasil e no mundo

A malária continua sendo um importante problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013, houve uma estimativa de 198 milhões de casos e 584 000 mortes causadas por esta doença em todo o mundo (OMS, 2014). No Brasil, a região amazônica (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) concentra a maioria dos casos no país, e o estado do Amazonas geralmente o que apresenta maior incidência. Em 2014, foram registrados 143.552 casos na região amazônica, e o estado do Amazonas contribuiu com 47%, seguido pelo Acre, com 22% (BRASIL, 2015).

A malária consiste numa doença causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo os principais causadores *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, o primeiro responsável pela forma considerada mais grave da doença. A transmissão se dá principalmente através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* parasitadas com o agente causador, e também, de forma infrequente, a infecção pode acontecer acidentalmente, como resultado de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas e/ou acidentes em laboratório (NEVES *et al.*, 2004).

Uma vez na corrente sanguínea, os parasitos multiplicam-se nos hepatócitos e, posteriormente, infectam e destroem os eritrócitos, provocando vários sintomas no hospedeiro, como febre, cefaleia, calafrios, vômitos, fadiga e anemia que iniciam geralmente de 10 a 15 dias após a picada do mosquito. Se não tratada, a malária pode apresentar complicações como edema pulmonar, problemas renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro (nos

casos graves da doença), situação que poderá levar à morte do indivíduo (FRANÇA *et al.*, 2008).

Atualmente, os fármacos utilizados na terapia antimalárica são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40, podendo ser classificados em 4 grupos: endoperóxidos de sesquiterpenos (fármacos baseados na artemisina), 4-aminoquinolinas, arilaminoálcoois, 8-aminoquinolinas, antifolatos, hidroxinaftoquinonas e tetraciclina (AMINA *et al.*, 2010).

A terapia antimalárica é feita geralmente através da combinação de 2 ou mais fármacos. De acordo com o Ministério de Saúde, o tratamento padrão para malária causada por *P. vivax* envolve o uso de cloroquina por 3 dias e primaquina por 7-14 dias, ou o uso de artemeter + lumefantrina, artesunato + mefloquina, primaquina, quinina e doxiciclina nos casos com *P. falciparum* (BRASIL, 2010). Porém, a resistência do *Plasmodium* aos esquemas terapêuticos existentes e a incidência de efeitos adversos têm incentivado a pesquisa de novas drogas para o tratamento da malária.

2.2 Derivados 8-aminoquinolínicos

As aminoquinolinas são substâncias derivadas da quinolina - composto aromático com dois anéis hexagonais fundidos, em que um carbono na posição 1 é substituído por um nitrogênio - conhecidas principalmente por suas propriedades antimaláricas. As 8-aminoquinolinas possuem uma amina na posição 8 da estrutura central da quinolina (Figura 1). A família de fármacos dessa classe incluem: pamaquina, primaquina e tafenoquina.

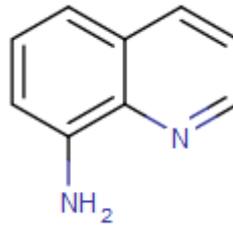


Figura 1. Estrutura química da 8-aminoquinolina. (Adaptado de NCBI, 2015).

2.2.1 Tafenoquina

A tafenoquina (TQ) é uma 8-aminoquinolina sintética, derivada da primaquina, identificada em 1978 no Instituto Walter Reed dos EUA. Atualmente está sob investigação (ensaios de fase III) para a cura radical e prevenção de recaídas em malária *vivax*, sendo a primeira 8-aminoquinolina a entrar em fase de testes clínicos para malária em 40 anos após a primaquina.

A TQ foi desenvolvida também com o objetivo de substituir a primaquina, único fármaco disponível na época para a cura da malária *vivax*, mas que apresentava rápida eliminação e necessitava de doses diárias por 2 semanas para a cura, além de causar toxicidade em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Por este motivo, pesquisas eram incentivadas com o objetivo de encontrar outras 8-aminoquinolonas com as mesmas propriedades que a primaquina, mas com uma meia-vida de eliminação mais longa, e menor toxicidade (ROSENTHAL, 2001).

2.2.1.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas da tafenoquina

A TQ possui um grupo adicional metoxil na posição 2, um grupo metil na posição 4 e uma substituição na posição 5 do anel quinolina por um 3-trifluorometil-fenoxil (Figura 2).

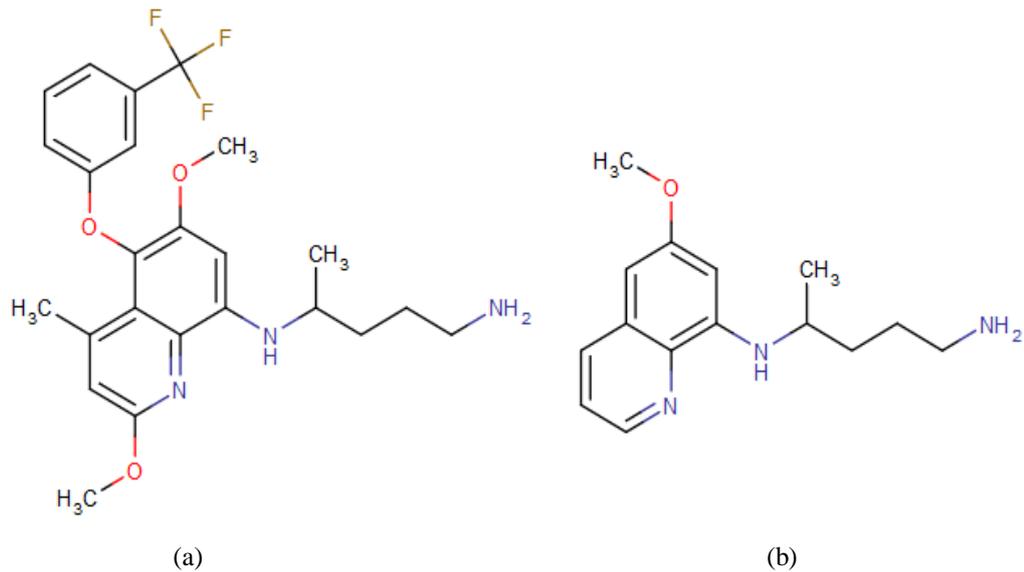


Figura 2. Estrutura química da tafenoquina (a) e primaquina (b). (Adaptado de NCBI, 2015).

Durante a guerra no Vietnã e com o aumento da resistência à cloroquina pelo *Plasmodium falciparum* no Sudoeste Asiático, houve uma maior preocupação quanto ao desenvolvimento de antimaláricos, incluindo-se a busca de melhorias nas características da primaquina. Diante disso, o Instituto Walter Reed dos EUA, em colaboração com outros grupos, incentivou a síntese e varredura de várias moléculas derivadas de 8-aminoquinolinas, com o objetivo de entender a relação estrutura-atividade dos substituintes e buscar novos compostos com maior efetividade e menor toxicidade (ROSENTHAL, 2001).

Foi verificado que uma substituição apropriada na posição 2 do núcleo da aminoquinolina resultava em um pequeno aumento na eficácia com diminuição da toxicidade sistêmica. Além disso, um grupo metil na posição 4 aumentaria a atividade terapêutica, porém também levaria a um aumento na toxicidade em estudos de múltiplas doses. Já um grupo fenoxil na posição 5 diminuiria a toxicidade enquanto manteria ou aumentaria a atividade. Adicionalmente, o substituinte na posição 5 provavelmente levaria ao efeito de retirada de elétrons e apresentaria um obstáculo para o metabolismo oxidativo dos outros substituintes, o que pode explicar a meia-vida de eliminação longa da tafenoquina. Estudos subsequentes então focaram no

desenvolvimento de derivados com combinações de substituintes nessas posições estratégicas do núcleo da estrutura das aminoquinolinas (ROSENTHAL, 2001).

As pesquisas levaram, então, à síntese dos primeiros compostos WR 225448 e da TQ, chamada inicialmente WR 238605. O composto WR 225448 difere da primaquina apenas em consequência do grupo metil, na posição 4, e um substituinte trifluorometil-fenoxil, na posição 5 (ROSENTHAL, 2001). A tafenoquina, como já mencionado, possui também um metoxil na posição 2 (Figura 2).

Quanto às características físico-químicas, as 8-aminoquinolinas apresentam solubilidade em água maior que 30 mg L^{-1} , sendo que primaquina apresenta maior habilidade de dissolver-se em fases aquosas. Quanto à lipofilicidade, o logP da tafenoquina é maior que o da primaquina, mostrando que a primeira apresenta maior lipofilicidade (logP da primaquina 1,64 e 5,81 da tafenoquina) (CASAS *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Farmacologia da TQ

Em 1998, Brueckner *et al.* realizaram o primeiro estudo da TQ em humanos, verificando que este fármaco tinha meia-vida cerca de 50 vezes maior que a primaquina e que causava alguns efeitos adversos, como cólicas, náuseas e diarreia, assim como a primaquina. Apesar dos efeitos adversos relatados, a TQ foi considerada bem tolerada pelos autores.

Estudos subsequentes foram realizados e, recentemente, a TQ foi selecionada para ensaios clínicos de fase III, em esquema terapêutico com cloroquina. Segundo Llanos-cuentas *et al.* (2014), a dose única de 300mg de TQ, coadministrada com cloroquina para prevenção de recaídas de malária *vivax*, foi mais eficaz que a terapêutica com somente a cloroquina.

Com relação ao mecanismo de ação, sabe-se que a TQ tem propriedades contra os hipnozoítos e pode ter também papel na profilaxia da malária *falciparum* (MARTINDALE, 2011), porém, o mecanismo de ação exato ainda é desconhecido, assim como das demais 8-aminoquinolinas. Sabe-se que o metabolismo de todas as 8-aminoquinolinas, via citocromo P-450, acontece a partir da ação de oxidases, principalmente CYP2D6, para intermediários reativos, o que é considerado crucial para os efeitos antimaláricos e tóxicos (PYBUS, *et al.*, 2012).

Quanto à farmacocinética, sabe-se que a TQ possui meia-vida de eliminação de 14 dias, atingindo um pico de concentração de 417-489 ng mL⁻¹ em voluntários saudáveis após dose de 600mg (BRUECKNER *et al.*, 1998), já Nasveld & Kitchener (2005) quantificaram 919 ng mL⁻¹ de TQ em plasma humano após 12h de administração oral. A TQ também apresenta largo volume de distribuição e baixo clearance, levando à eliminação lenta, o que facilita a adesão ao tratamento uma vez que a frequência de administração do medicamento diminui.

Sabe-se também que a concentração atingida após administração parece ser 1,7 a 1,8 vezes maior no sangue venoso do que no plasma, indicando que o fármaco é mais concentrado nas hemácias (BRUECKNER *et al.*, 1998), o que é esperado no caso de antimaláricos.

Sobre toxicidade, já foi relatado hemólise em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase que fizeram uso de TQ, assim como primaquina e pamaquina (BUELTER, 1994).

2.2.1.3 Métodos desenvolvidos para quantificação de TQ em amostras biológicas

O primeiro estudo para quantificar TQ em plasma foi desenvolvido por Karle & Olmeda (1988) para estimar os parâmetros farmacocinéticos a partir um estudo piloto em cães beagles. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método para quantificar a TQ por cromatografia

líquida e detecção eletroquímica. A curva analítica foi feita de 50-1000 ng mL⁻¹ de plasma humano fortificado com a solução padrão e o estudo piloto realizado a partir de uma dose de 4 mg kg⁻¹.

Outro estudo para quantificar a mistura racêmica de WR 238,605 foi realizado por Karle *et al.* (1995). O método envolvia uma etapa de extração líquido-líquido de 0,5mL de amostra de plasma com a mistura de 2-propanol-hexano (3:5) com 0,4% de dietilamina e injeção direta do extrato através da coluna, com detecção por fluorescência. Neste estudo, o limite de quantificação foi 10 ng mL⁻¹ para cada enantiômetro.

Kocisko *et al.* (2000) desenvolveram um método para quantificar TQ em plasma humano e em sangue venoso e capilar por HPLC e detecção por fluorescência. Neste estudo, a TQ foi quantificada logo após a precipitação de proteínas com sulfato de zinco (ZnSO₄) e acetonitrila. O limite de quantificação em ambos os fluidos foi 10 ng mL⁻¹ e curva de calibração de 10-1500 ng mL⁻¹.

Doyle *et al.* (2002) também desenvolveram um método rápido para quantificação de TQ em pequena quantidade de plasma humano (50µL) após precipitação de proteínas, utilizando HPLC e espectrometria de massas. A linearidade foi demonstrada na faixa de 2-500 ng mL⁻¹. O método foi aplicado em amostras clínicas de voluntários saudáveis que receberam doses de 25-400mg de TQ diariamente, durante 3 dias, com o objetivo de avaliar a farmacocinética do fármaco.

Em 2011, Romsing *et al.* desenvolveram e validaram um método para quantificar TQ em plasma e sangue capilar humano. Este método utilizou 100µL de sangue capilar coletado em filtro de papel - chamado de técnica DBS (*Dried Blood Spot*) - e 100µL de plasma. Foram obtidas baixas taxas de recuperação (36-49% no DBS e 60% em plasma) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ) 50nmol L⁻¹.

2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid*

Microextraction – DLLME)

Diferentes técnicas de preparo de amostras têm sido propostas em substituição às técnicas clássicas de extração, pois estas, muitas vezes, demandam mais tempo para execução, grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver várias etapas que estão associadas com perdas de analito e ocorrência de contaminação (OJEDA & ROJAS, 2011). Diante disso, métodos baseados em microextração vêm sendo desenvolvidos como alternativas para o preparo de amostras.

A microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction - DLLME*) foi uma técnica de microextração desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água. Trata-se de uma técnica baseada em um sistema ternário de solventes, de forma semelhante ao que ocorre na extração líquido-líquido homogênea (*homogeneous liquid-liquid extraction – HLLE*). A DLLME é, atualmente, uma alternativa interessante para o preparo de amostra visando à determinação de compostos orgânicos em diferentes matrizes (BORGES *et al.*, 2015).

Esta técnica de extração utiliza a partição dos analitos de interesse empregando pequenos volumes de uma mistura formada por um solvente dispersor e um solvente extrator. O solvente dispersor deve ser miscível na amostra (fase aquosa) e no solvente extrator (fase orgânica), para constituir um sistema ternário de fases, o que irá promover a concentração dos analitos no solvente extrator. A mistura obtida pela injeção rápida de um jato da mistura de solventes extrator e dispersor na amostra promove a dispersão do solvente extrator na forma de microgotas com grande área superficial, onde ocorre a partição. A grande área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa promove uma rápida e eficiente transferência dos analitos

da fase aquosa para a fase extratora. Na figura 3 pode ser verificado um diagrama simplificado das etapas da DLLME.

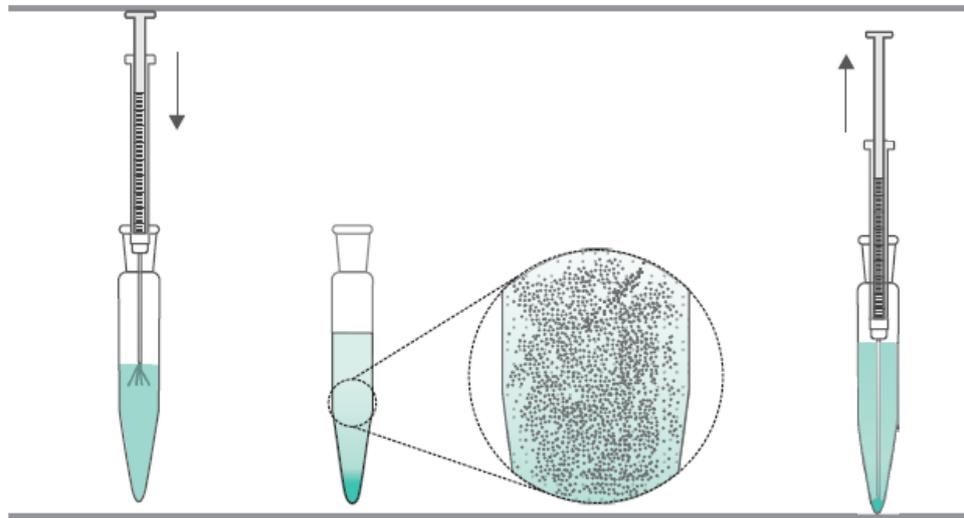


Figura 3. Diagrama simplificado das etapas da DLLME: (1) Injeção rápida de um jato da mistura de solventes extrator e dispersor na amostra. (2) Dispersão do solvente extrator na forma de microgotas. (3) separação e retirada do solvente extrator para análise. (Adaptado de BORGES *et al.*, 2015).

As principais vantagens da DLLME são: menor uso de solventes orgânicos, rapidez na execução (apenas uma etapa), simplicidade de operação, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento, além de possibilitar a aplicação na extração e concentração de grande variedade de compostos orgânicos e em diversas matrizes biológicas, como sangue, urina e plasma. A principal desvantagem citada é o uso de solventes tóxicos e a etapa de centrifugação, que dificulta a automação da técnica (MOREIRA, *et al.*, 2014).

2.3.1 Fundamentação teórica

Conforme verificado na figura 3, a DLLME é realizada em duas etapas. Na primeira, é injetada, na amostra aquosa que contém o analito, uma mistura dos solventes extrator e dispersor. Em geral, utiliza-se de 10 a 500 μL de solvente extrator e 0,5 a 2,0 mL de solvente

dispersão para um volume de 5 a 10 mL de amostra. A partir disso, o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas, extraindo o analito, o que corresponde à segunda etapa. Essa dispersão do solvente extrator é favorecida pelo solvente dispersor, que é solúvel na fase aquosa e na fase orgânica. A solução turva resultante é, então, centrifugada, e a fase orgânica é sedimentada no fundo do tubo, geralmente devido à alta densidade do solvente extrator. Em seguida, a fase orgânica é coletada e analisada (BORGES *et al.*, 2015).

2.3.2 Fatores que afetam a DLLME

2.3.2.1 Tipo e volume dos solventes extrator e dispersor

O volume da fase sedimentada é afetado diretamente pelo tipo e volume dos solventes extratores e dispersores. Quanto ao solvente extrator, geralmente as seguintes características são desejáveis: densidade maior que a da água, permitindo a formação da fase sedimentada; pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas de solvente durante o processo de extração e baixa solubilidade em água, permitindo a separação adequada do extrato orgânico. Além disso, o solvente extrator deve ter capacidade de extração dos analitos de interesse e de formar dispersão na forma de microgotas na presença do solvente dispersor, além de ser adequado à técnica analítica escolhida (BORGES *et al.*, 2015).

Já o solvente dispersor deve ser selecionado com base na solubilidade da fase aquosa e orgânica. O volume do solvente dispersor afeta diretamente o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração. O volume de solvente dispersor afeta também o fator de concentração da DLLME. Isso significa que, quanto maior o volume do solvente extrator, maior o volume da fase sedimentada obtida após a centrifugação,

resultando em um menor fator de concentração. Portanto, o volume ótimo de solvente dispersor é o que garante um alto fator de concentração e, ao mesmo tempo, permite um volume de fase sedimentada suficiente para as análises necessárias (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2011).

2.3.2.2 Tempo de extração

Na DLLME, o equilíbrio de partição entre os analitos entre a fase orgânica e a aquosa é atingido muito rapidamente. Na prática, é definido como tempo de extração o tempo compreendido entre a injeção da mistura de solventes e o final da centrifugação (BORGES *et al.*, 2015).

2.3.2.3 pH

O ajuste do pH deve permitir que os analitos estejam na forma neutra, o que permite maior extração pelo solvente orgânico e, conseqüentemente, maior extração (BORGES *et al.*, 2015).

2.4 Preparação de amostras de origem biológica

A análise de amostras biológicas, como plasma, urina e soro, é extremamente utilizada, mas demanda um tratamento específico. Isso acontece porque, além de as amostras biológicas apresentarem compostos endógenos de diversas propriedades (hormônios, neurotransmissores, etc), a concentração dos analitos quase sempre é muito baixa. Os fármacos e/ou os metabólitos também ligam-se às proteínas, o que constitui um obstáculo a mais na quantificação (CASS & DEGANI, 2001).

Para isso, é necessário um pré-tratamento de amostras e entre esses procedimentos adicionais, especialmente tratando-se de plasma ou soro, pode-se citar a precipitação de

proteínas, que visa reduzir os interferentes da matriz e evitar o entupimento da coluna cromatográfica (MOREIRA *et al.*,2014).

A ligação às proteínas pode ser quebrada por uma variedade de métodos, como: aquecimento, tratamento com ácidos, bases ou solventes orgânicos miscíveis com a água, como metanol, acetonitrila e etanol, ou com o uso de mistura de sulfato de zinco a 15% (p/v) com acetonitrila. Entretanto, em todos estes procedimentos, o sobrenadante deve ser compatível com o procedimento de extração (MOREIRA *et al.*,2014).

Outra vantagem do pré-tratamento com precipitação de proteínas para o caso específico de DLLME é que este procedimento diminui também a viscosidade do plasma, o que facilita a dispersão dos solventes extrator e dispersor na amostra. Após esse procedimento, a proteína precipitada é, então, separada após centrifugação e o sobrenadante é submetido ao processo de extração (CASS & DEGANI, 2001).

2.5 Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos

O desenvolvimento de um método bioanalítico consiste no estabelecimento do procedimento de extração e das condições cromatográficas ótimas para detectar e/ou quantificar um analito específico em uma matriz biológica (CASS & DEGANI, 2001). Nesta etapa, também pode ser realizada a otimização de alguns parâmetros importantes, como a escolha dos solventes utilizados, tempo de extração, fase móvel, coluna cromatográfica e outros, a fim de definir a forma que proporcione maior recuperação. A partir de então, segue-se a etapa de validação, conforme figura 4.

1. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO
<ul style="list-style-type: none"> • Definição do procedimento de extração, que inclui a escolha do solvente extrator, tempo de extração, pH, etc. • Definição das condições cromatográficas: fase móvel, coluna cromatográfica.
2. VALIDAÇÃO
<ul style="list-style-type: none"> • SELETIVIDADE • SENSIBILIDADE • LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO • LIMITE DE DETECÇÃO • ESTABILIDADE • LINEARIDADE • PRECISÃO • EXATIDÃO • RECUPERAÇÃO • ROBUSTEZ
3. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO

Figura 4. Desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico. (Adaptado de CASS & DEGANI, 2001).

A validação é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método desenvolvido é confiável ao que se aplica (CASS & DEGANI, 2001). É, portanto, uma etapa necessária após qualquer desenvolvimento de método analítico. Na prática, consiste em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas. Os parâmetros avaliados dependem do tipo de análise, da matriz utilizada e da finalidade do método, e estão previstos em legislação específica.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (MOREAU et al, 2008). Esses órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, no qual está em vigência a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

Em nível mundial, o US FDA (*United States Food and Drug Administration*) disponibiliza guias para a validação de métodos bioanalíticos utilizados por vários países como modelo para implementação de suas resoluções.

2.5.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004). Esses termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, figuras analíticas de mérito (MOREAU *et al.*, 2008).

De acordo com a ANVISA e FDA, são requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos: seletividade, precisão, exatidão, recuperação, linearidade e estabilidade.

2.5.1.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra (FDA, 2001). Tais componentes podem incluir impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz. Uma boa seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (MOREAU *et al.*, 2008). Portanto, se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e na validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método, pois algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente e que podem co-eluir com a substância de interesse (MOREAU *et al.*, 2008).

A seletividade de um método cromatográfico é realizada comparando a matriz isenta do analito (amostra branco) e a matriz adicionada com a substância padrão e, nesse caso, nenhum

interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (MOREAU *et al.*, 2008).

Outro procedimento que poderá também ser utilizado é realizado através da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou mesmo com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura do analito de interesse, por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.1.2 Linearidade

A curva de calibração é utilizada para avaliar a linearidade do método, que consiste na capacidade de demonstrar, dentro de um intervalo especificado, que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração da substância deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica ou de calibração (MOREAU *et al.*, 2008), descrita abaixo:

$$Y = ax + b$$

onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear.

Porém, esta equação só é válida em um determinado intervalo de concentração do composto analisado, chamado de *faixa linear dinâmica*.

O modelo linear de cálculo é preferencial, por ser mais simples e descrever adequadamente a relação concentração-resposta. Adicionalmente, calcula-se o coeficiente de

correlação r ou coeficiente de determinação r^2 , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

Os critérios de aceitação da curva de calibração, segundo o FDA (2001) são:

- A curva de calibração deve possuir de 6-8 concentrações de amostras, incluindo o LIQ.
- A resposta do LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do analito.
- O pico de resposta do analito deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%.
- Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração teórica para o LIQ.
- Desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração teórica para as outras concentrações da curva de calibração.
- Pelo menos 4 das 6 concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração.

2.5.1.3 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ é a menor concentração de um analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando-se um método específico (ANVISA, 2012). Geralmente, o LIQ é o menor ponto da curva de calibração. No entanto, o LIQ pode ser calculado utilizando-se o método visual, a relação sinal-ruído ou baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém, em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição não é trivial e, às vezes, é subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Portanto, a melhor opção para isso é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável (MOREAU *et al*, 2008). De acordo com o FDA (2001), o pico de resposta do fármaco no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80-120% e deve ter resposta no mínimo 5 vezes maior que o branco.

2.5.1.4 Exatidão

Corresponde à proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro ou de referência (ANVISA, 2003), e é avaliado através do erro padrão relativo, que pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$EPR = \frac{CME - VN}{VN} \times 100$$

Sendo:

EPR: Erro Padrão Relativo

CME: Concentração média experimental

VN: Valor Nominal

Conforme pode ser observado, o EPR corresponde à relação entre a concentração média determinada experimentalmente e o valor nominal. Não são aceitos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (FDA, 2001).

Recomenda-se que a avaliação da exatidão seja feita com, no mínimo, 3 concentrações que contemplem o intervalo linear do procedimento, com cinco repetições cada. Essas concentrações devem representar a curva de calibração como um todo e deve conter uma concentração baixa (de até 3 vezes o LIQ do método), uma média (próxima ao centro da curva de calibração) e uma alta (próxima da parte superior ou limite da curva) (FDA, 2001).

Devido às características de avaliação da exatidão, recomenda-se que seja determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da sensibilidade do método. É, ainda, recomendado pela ANVISA e FDA, avaliá-la em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas diferentes (exatidão intercorridas).

2.5.1.5 Precisão

Precisão significa a habilidade de reproduzir o mesmo resultado, embora não necessariamente o correto, sempre que o procedimento é executado (CASS & DEGANI, 2001). Em termos de validação de métodos, corresponde à avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (FDA, 2001).

O valor da precisão depende de erros indeterminados, aleatórios e impossíveis de serem eliminados (CHASIN *et al.*, 1998). Essa variabilidade pode ser avaliada em diversas condições: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

a) Repetibilidade (precisão intra-corrída)

Corresponde à concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método com as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesma instrumentação utilizada sob as mesmas condições e mesmo local (MOREAU *et al.*, 2008).

b) Precisão Intermediária (precisão inter-corridas)

Avalia a concordância dos resultados obtidos de um laboratório em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

c) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

Corresponde à concordância dos resultados obtidos em laboratórios diferentes e analistas diferentes. É geralmente aplicada aos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em padronização de procedimentos a serem incluídos em farmacopéias, por exemplo (RIBANI *et al.*, 2004).

Assim como a exatidão, a precisão deve ser mensurada utilizando, no mínimo, 5 replicatas em, pelo menos, três concentrações (baixa, média e alta) e deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de todos os valores obtidos, não se admitindo valores superiores a 15%, à exceção do LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (FDA, 2001).

2.5.1.6 Recuperação

Recuperação avalia a eficiência da extração de um método analítico. Pode ser calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Média do valor obtido} \times 100}{\text{Média do valor adicionado}}$$

De acordo com o FDA, a recuperação de um método bioanalítico não precisa apresentar valores de 100%, mas precisa ser precisa e exata. É recomendado que os experimentos de

recuperação sejam realizados em três níveis de concentração (baixa, média e alta), com o padrão não extraído representando 100% de recuperação.

2.5.1.7 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade visam determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas (FDA, 2001; ANVISA, 2012). A menos que os dados de estabilidade de um analito estejam presentes na literatura, a validação de um método deve incluir a verificação da estabilidade durante os vários estágios da análise, incluindo-se a estocagem (PETERS *et al.*, 2007).

A estabilidade de uma substância em uma matriz biológica depende de suas características físico-químicas, da matriz e do material de acondicionamento utilizado. Os resultados obtidos para um tipo de matriz não poderão ser extrapolados para outra, uma vez que as propriedades físico-químicas já estariam alteradas e uma nova validação seria necessária (FDA, 2001; ANVISA, 2012).

Durante a realização dos ensaios de estabilidade, devem ser reproduzidas as mesmas condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo. De acordo com a legislação vigente, os seguintes estudos devem ser realizados para demonstrar a estabilidade do analito em uma determinada matriz biológica: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, longa duração e estabilidade pós-processamento. É demonstrada estabilidade quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal (FDA, 2001; ANVISA, 2012).

a) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Neste ensaio, as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por, no mínimo, 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas por, no mínimo, 12 horas, e assim sucessivamente, quantificando-se o analito após o terceiro ciclo. No mínimo, duas concentrações devem ser utilizadas, sendo uma alta e outra baixa, em triplicata (FDA, 2001).

b) Estabilidade de curta duração

Para verificação da estabilidade de curta duração, utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de 4 a 24 horas, baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente, e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (FDA, 2001).

c) Estabilidade de longa duração

O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última. Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três de cada concentração baixa e alta, determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste (MOREAU *et al.*, 2008).

d) Estabilidade pós-processamento

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do analito na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, quando houver. O estudo deve ocorrer na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica (MOREAU *et al.*, 2008).

e) Estabilidade do analito em solução

É recomendado que seja avaliada a estabilidade das soluções-padrão do analito por, no mínimo, seis horas após a preparação, em temperatura ambiente. Se solução for armazenada sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento. Os resultados, provenientes das soluções em estudo, devem ser comparados com os obtidos através das soluções recém preparadas do analito e Padrão Interno (PI), quando houver.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o emprego da microextração líquido-líquido dispersiva para a determinação da tafenoquina em plasma humano.

3.2 Específicos

3.2.1 Otimizar um método bioanalítico para a quantificação da tafenoquina empregando a técnica escolhida;

3.2.2 Validar o método bioanalítico desenvolvido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados como constituintes majoritários da fase móvel – metanol e acetonitrila – foram grau cromatográfico, obtidos da J. T. Baker (EUA para acetonitrila e Trindade e Tobago para metanol). O ácido acético glacial o acetato de sódio utilizado para preparar a solução a 10 mmol L^{-1} , foram todos grau PA.

Os demais reagentes empregados durante o processo de extração do analito das amostras, foram também grau PA. A água empregada na preparação das soluções e fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q-Plus® (Millipore Corporation Bedford, EUA).

A maioria dos solventes utilizados na fase de otimização do método (tetracloreto de carbono, dicloroetano, clorofórmio, tetracloroetileno) foram grau analítico, com exceção da acetona que possuía grau cromatográfico e foi adquirida da J. T. Baker.

4.1.2 Equipamentos

4.1.2.1 Sistema cromatográfico

Para o desenvolvimento e validação do método em HPLC, utilizou-se o cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20AT Prominence, degaseificador DGU-20AS, injetor automático de amostras SIL-20A HT, comunicador de módulos CBM-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A. O programa utilizado para avaliação dos resultados obtidos foi o Lcsolutions.

4.1.2.2 Coluna cromatográfica

Foi utilizada uma coluna Supelcosil LC-18-DB (15cm x 4,6mm), contendo a fase estacionária octadecilsilano (C18), constituída de partículas de 5mm de diâmetro. Para análise das amostras de plasma, utilizou-se também uma pré-coluna C18 (4,4 mm x 4,6 µm), com partículas de 5mm de diâmetro, adquirida da Thermo Scientific.

4.1.2.3 Outros equipamentos e materiais utilizados

Foram utilizados durante a etapa de preparação das amostras empregando a DLLME: um agitador para tubos do tipo vortex (modelo AV-2, Gehaka, Brasil), um banho ultrassônico (modelo USC-1400, Unique, Brasil), uma centrífuga (modelo 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo) e outros materiais como: tubos do tipo Falcon (fundo cônico, tampa rosca e capacidade de 15mL), tubos de ensaio de vidro com fundo redondo, membrana de filtração com 0,22 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro, um sistema de filtração a vácuo de vidro e microseringa (modelo LC FN, Agilent Technologies) com capacidade de 500µL.

Para a verificação do comprimento de onda de absorção máximo da TQ foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis com celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico (Shimadzu). Outros equipamentos utilizados incluem um pHmetro (modelo PG1800, Gehaka, Brasil), para verificação do pH da solução de acetato de sódio 10 mmolL⁻¹ e da fase móvel.

4.1.3 Soluções padrão

O padrão de succinato de tafenoquina (TQ) utilizado na preparação das soluções-padrão foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Inicialmente, foi preparado 20mL de solução

de TQ $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol grau cromatográfico (solução-mãe). A partir dessa solução, foram preparadas as soluções-padrão, por diluições sucessivas em metanol, nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 10, 15, 20, 25 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os experimentos de validação do método. Durante o desenvolvimento do método foram utilizadas soluções de 1, 10 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtidas também a partir de uma solução de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TQ. Todas as soluções foram estocadas a -20°C e protegidas da luz durante todo o processo.

4.1.4 Amostras de plasma

Durante o desenvolvimento e validação do método, foram utilizadas amostras de plasma humano livres de TQ, provenientes da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), já existentes no laboratório onde os ensaios foram realizados. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise, quando eram descongeladas à temperatura ambiente antes do início dos procedimentos.

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimento de preparação das amostras

Durante a fase de desenvolvimento do método, as amostras de plasma foram fortificadas com $25 \mu\text{L}$ da solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TQ, gerando uma concentração de 500 ng mL^{-1} em plasma. O plasma fortificado foi, então, submetido à etapa de precipitação de proteínas e, em seguida, ao procedimento de extração.

4.2.1.1 Precipitação das proteínas

Antes de iniciar os procedimentos de extração do analito, as proteínas do plasma foram precipitadas com solução de sulfato de zinco heptahidratado 10%. Para isso, adicionou-se 1 mL desta solução em 500 μL de plasma, seguindo à homogeneização por 60 segundos no vórtex e centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e submeteu-o ao processo de extração.

4.2.2 Extração utilizando a técnica de Microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME*)

Ao sobrenadante, obtido após a fase de precipitação de proteínas, foi adicionado 3 mL de água purificada e 100 μL de solução NaOH 0,5 mol L⁻¹. Seguiu-se à agitação no vórtex por 15 segundos e adicionou-se 1 mL da mistura de solventes, cuja concentração e solventes definidos antes da otimização do método foi ACN:CCl₄ (9:1). Em seguida, agitou-se por 60 segundos no vórtex (tempo de extração) e centrifugou-se o sistema por 5 min a 3500 rpm. Coletou-se o precipitado com ajuda de uma microsseringa, transferindo-o para um tubo de ensaio de vidro com fundo redondo. O solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de fase móvel e 70 μL foram cromatografados. Amostras de plasma livre de TQ também foram processadas para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma.

4.2.3 Análise cromatográfica

A detecção foi feita empregando o detector UV-Vis, em 262 nm, com vazão de 1 mL/min. As injeções somente eram realizadas após o condicionamento da coluna com a fase móvel por, no mínimo, 30 minutos, até a estabilização da linha de base. No final da avaliação diária,

procedia-se à lavagem da coluna com solução de ACN:H₂O (5:5). As etapas da fase de desenvolvimento do método estão esquematizadas na figura 5.

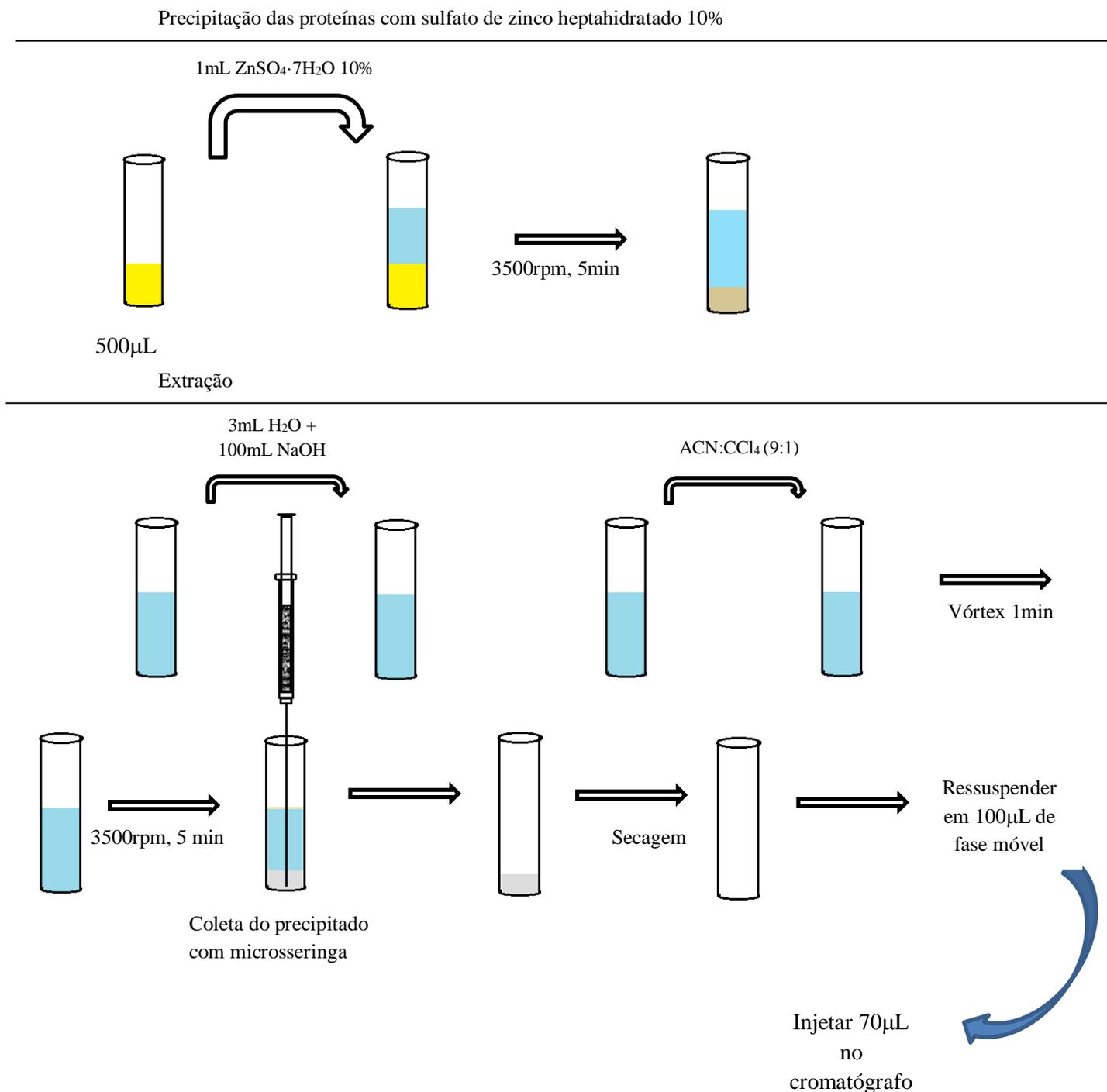


Figura 5. Etapas da fase de desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de TQ.

4.2.4 Otimização

A otimização do método desenvolvido foi realizada em 5 etapas: avaliação do solvente extrator, solvente dispersor, volume do solvente extrator, avaliação do pH e tempo de extração.

Em todas as análises, foram utilizados 500 μL de plasma fortificados com 100 μL da solução padrão de TQ $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método de preparação das amostras ocorreu conforme descrito no item 4.2.1 e as extrações foram avaliadas em triplicata. Os itens de avaliação estão listados na figura 6.

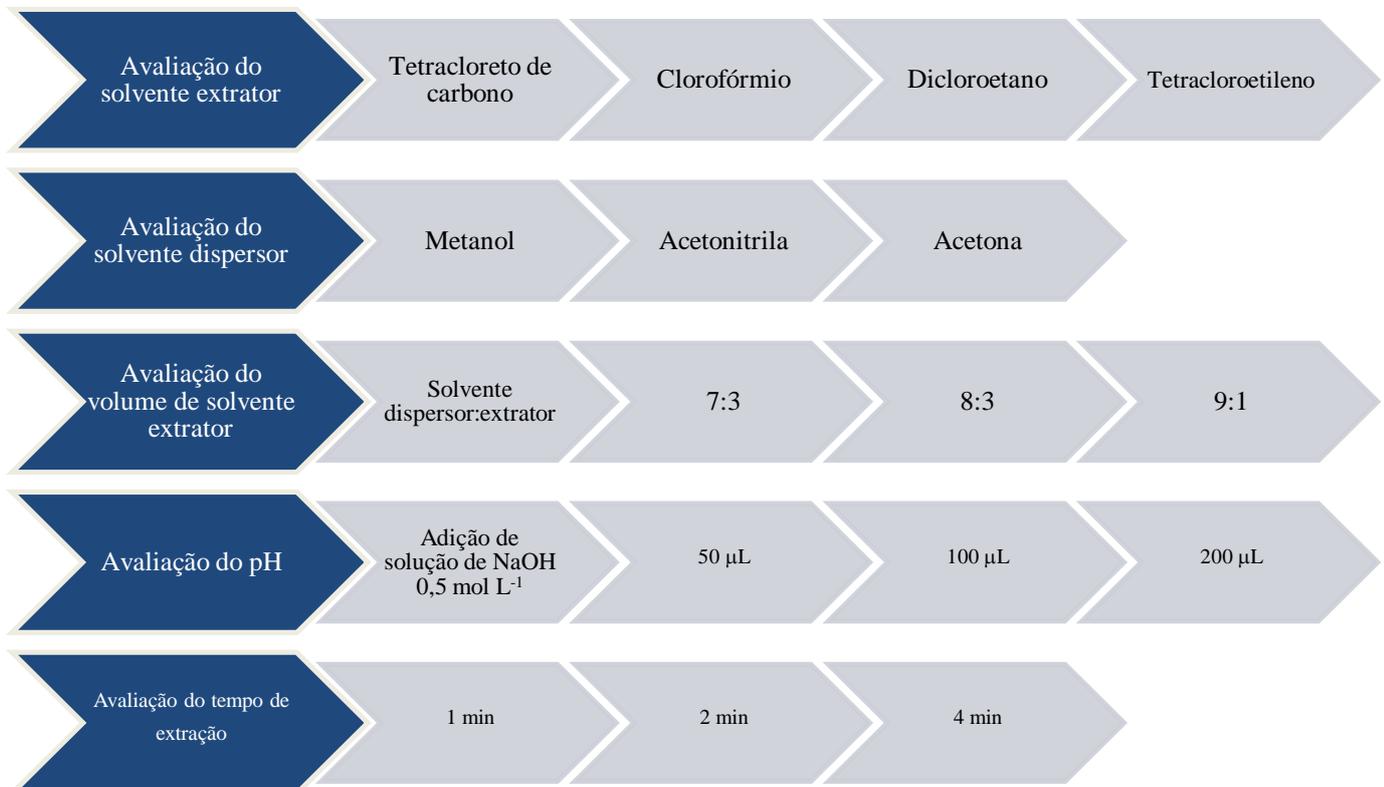


Figura 6. Itens avaliados para otimização do método desenvolvido para determinação da tafenoquina em plasma humano.

A definição das condições otimizadas foi feita de acordo com a maior média das áreas obtidas nos cromatogramas em cada item avaliado.

4.2.5 Validação do método desenvolvido

Os procedimentos de validação do método bioanalítico desenvolvido neste trabalho foram baseados no guia publicado pelo FDA (2001) intitulado *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*.

4.2.5.1 Seletividade

Foram avaliadas 6 amostras isentas do analito e comparadas com amostras contendo TQ na concentração referente ao LIQ. A comparação foi feita com o objetivo de verificar possíveis interferentes eluindo no tempo de retenção da TQ, cujo pico deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra.

4.2.5.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas de calibração de amostras de plasma previamente fortificadas nas concentrações de 50, 100, 200, 500, 1000 e 1500 ng de TQ por mL de plasma, em triplicata. As amostras foram submetidas ao processo de extração e posterior análise cromatográfica.

A análise estatística dos dados foi obtida pelo método da regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação $y = ax + b$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Foi calculado o coeficiente de determinação r^2 utilizando o LIQ como limite inferior, estabelecendo-se como valores aceitáveis de $r^2 > 0,99$. Desvio padrão menor ou igual a 15% em relação às concentrações teóricas da curva de calibração também foi estabelecido na avaliação da linearidade.

4.2.5.3 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

Para avaliar o LIQ, foram avaliadas amostras de plasma fortificadas com TQ na concentração de 50 ng mL^{-1} , em quintuplicata, e submetidas ao processo de extração e análise cromatográfica. Tais amostras foram analisadas utilizando-se de curvas analíticas obtidas de amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 50, 100, 200, 500, 1000 e 1500 ng de TQ por mL de plasma, em duplicata para cada concentração. Foi estabelecido resposta do LIQ com precisão de 20% e exatidão de 80-120% em relação à concentração teórica.

4.2.5.4 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método desenvolvido, amostras de $500 \mu\text{L}$ de plasma foram fortificadas com TQ nas concentrações de 150, 750 e 1250 ng mL^{-1} , em quintuplicata para cada concentração. As concentrações de TQ nas amostras foram determinadas através de curva analítica preparada no mesmo dia, como descrito no item Limite Inferior de Quantificação (LIQ).

Para os ensaios de precisão e exatidão interensaios, amostras de plasma fortificadas com TQ nas concentrações de 150, 750 e 1250 ng mL^{-1} , em quintuplicata para cada concentração, foram analisadas durante três dias consecutivos. Da mesma forma, para cada dia de análise, foi empregado uma nova curva analítica, conforme descrito anteriormente.

4.2.5.5 Recuperação

Para avaliar a recuperação, amostras de $500 \mu\text{L}$ de plasma foram fortificadas com TQ nas concentrações de 150, 750 e 1250 ng mL^{-1} , em triplicata para cada concentração, e foram

analisadas pelo método proposto. A concentração obtida foi calculada empregando-se curvas analíticas construídas com dados resultantes da análise direta de soluções-padrão não submetidas ao processo de extração, em duplicata para cada concentração.

4.2.5.6 Estabilidade

Neste teste, a estabilidade da TQ foi avaliada em ciclos de congelamento e descongelamento e também estabilidade de curta duração, utilizando-se do método proposto.

Para avaliar a estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, utilizou-se amostras de plasma fortificadas na concentração de 150 ng mL⁻¹ (concentração baixa) e 1250 ng mL⁻¹ (concentração alta), em triplicata para cada concentração. Essas amostras foram congeladas a -20°C por 24h e então descongeladas à temperatura ambiente. Após totalmente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C por 12h. O ciclo de congelamento e descongelamento foi novamente repetido, quantificando-se a TQ após o terceiro ciclo.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração, utilizou-se de amostras de plasma fortificadas na concentração de 150 ng mL⁻¹ (concentração baixa) e 1250 ng mL⁻¹ (concentração alta), em triplicata para cada concentração. As amostras foram mantidas por 12 horas sobre a bancada de trabalho, quantificando-se a TQ ao final desse tempo. Os resultados foram comparados com os obtidos com amostras frescas, utilizando-se do teste t de student, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico GraphPad Prism® (GraphPad Software, EUA) foi empregado nestas análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do espectro de varredura no ultravioleta

A determinação do espectro de varredura na região ultravioleta foi realizada para a escolha do comprimento de onda ideal utilizado no método analítico. Foi preparada uma solução de TQ em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} e, posteriormente, diluída para $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. O intervalo de absorção mais intenso está situado entre 240 a 280nm e o comprimento de onda de 262 nm foi o escolhido para a análise da TQ, corroborando outro trabalho descrito na literatura (ROMSING *et al.*, 2011).

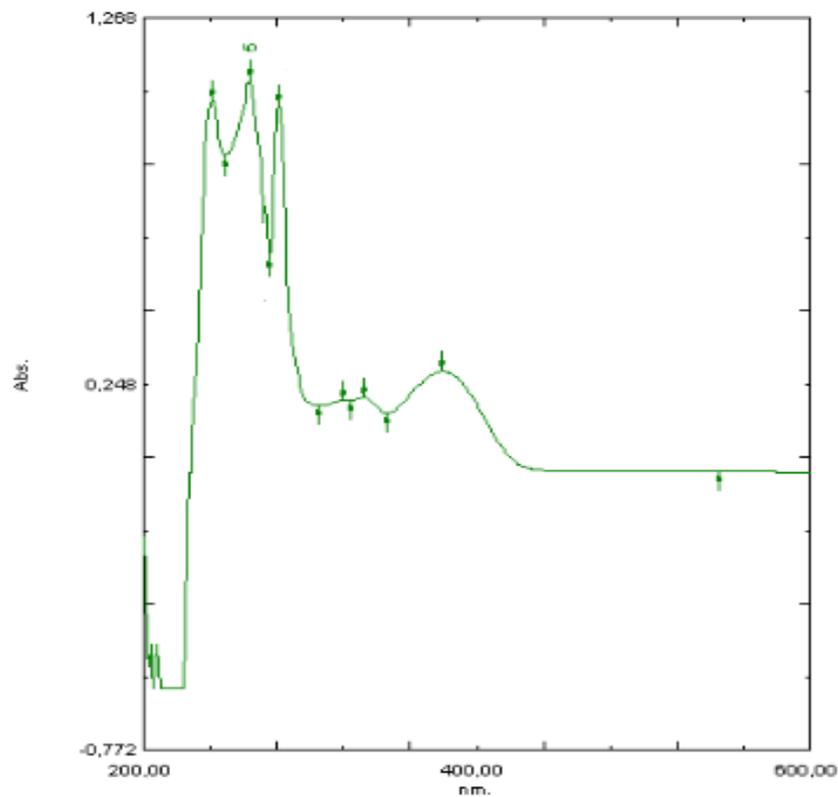


Figura 7. Espectro de absorção na região ultravioleta da TQ (solução preparada em metanol na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

5.2 Definição da fase móvel

Em cromatografia no modo reverso, metodologia mais utilizada em HPLC, a fase móvel mais comumente empregada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando

necessário, substituída por metanol ou tetraidrofurano (THF) (CASS & DEGANI, 2001). Com base nas características físico-químicas da TQ, em trabalhos publicados utilizando HPLC e das características da coluna cromatográfica utilizada, foram avaliadas as seguintes composições de fases móveis:

Tabela 1. Avaliação de fase móvel composta por ACN, H₂O e CH₃COOH para determinação da tafenoquina em plasma humano.

Fase Móvel	Tempo de retenção (min)	pH (26°C)
ACN:H ₂ O (50:50) + 0,1% CH ₃ COOH	6,1	3,04
ACN:H ₂ O (50:50) + 0,5% CH ₃ COOH	4,4	2,67
ACN:H ₂ O (45:55) + 0,5% CH ₃ COOH	5,5	2,67
ACN:H ₂ O (40:60) + 0,5% CH ₃ COOH	17,4	2,67

O princípio da retenção é a hidrofobia. A separação se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa (CASS & DEGANI, 2001). No uso das fases móveis descritas na Tabela 1, observou-se que reduzindo a proporção de ACN na fase móvel aumentou-se o Tempo de Retenção (TR) e, diminuindo o pH do meio, diminuía-se este valor. Este fato deve-se à característica de base fraca da TQ, que se torna mais ionizada em meio mais ácido e, portanto, com menor afinidade pela coluna cromatográfica utilizada, diminuindo-se o TR. Além disso, diminuindo-se a proporção de ACN na FM, aumentou-se a polaridade da mesma, diminuindo consequentemente a afinidade da TQ pela FM, aumentando-se o TR.

Após várias análises com o padrão de TQ e a FM composta por ACN, H₂O e ácido acético, nas proporções listadas na Tabela 1, foram observadas variações de até 1,5 minuto no TR na mesma proporção de FM, o que não é desejável. Isso pode ter acontecido devido a variações do pH, uma vez que o ácido acético utilizado é volátil, promovendo variações de pH

na fase móvel, levando à variação no TR. Diante disso, e com base em outros métodos analíticos com TQ, optou-se por utilizar uma solução de acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ (pH 6,7 a 25,6°C) na fase móvel, a fim de manter o pH em uma faixa constante.

A nova fase móvel utilizada foi ACN:MeOH:acetato (20:60:20, v/v/v), obtendo-se TR de 16 min. Aumentou-se, então, a quantidade de ACN no sistema, com o objetivo de diminuir o TR, porém, isso não aconteceu, e o TR aumentou para 18 min, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Diante disso, decidiu-se acrescentar à FM 0,1% de ácido acético, a fim de diminuir o pH e tornar a molécula de TQ mais ionizada e diminuir o TR. Obteve-se, então, TR de 12 min. Esta fase móvel foi definida para a avaliação dos extratos de plasma. Esses resultados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação de fase móvel composta por ACN, MeOH e solução de acetato de sódio 10 mmol L⁻¹, para determinação da tafenoquina em plasma humano.

Fase móvel	Tempo de Retenção (min)
ACN:MeOH:acetato de sódio (15:65:20, v/v/v)	19
ACN:MeOH:acetato de sódio (20:60:20, v/v/v)	16
ACN:MeOH:acetato de sódio (25:55:20, v/v/v)	18
ACN:MeOH:acetato de sódio (30:50:20, v/v/v)	20
ACN:MeOH:acetato de sódio (30:50:20, v/v/v) + 0,1% CH ₃ COOH	12

A fase móvel, após preparada, era desgaseificada no ultrassom durante 3 minutos, para eliminar gases dissolvidos que poderiam interferir na análise, e filtrada em membranas com poros de 0,45µm e diâmetro de 5cm (Sartorius Stedim Biotec, EUA).

5.3 Procedimento de preparação das amostras

Antes de verificar o método e a melhor forma de extração, observou-se as características físico-químicas da TQ, tais como pKa, coeficiente de partição, polaridade e solubilidade. A TQ

é menos solúvel em água em relação à primaquina ($\log P$ da tafenoquina é 5,81 e da primaquina 1,64), e apresenta caráter básico (pK_a 10,20) (CASAS *et al.*, 2014).

5.3.1 Otimização do sistema DLLME

5.3.1.1 Solvente extrator

A escolha do solvente extrator é um fator fundamental para a capacidade de extração de um analito em DLLME. Em geral, um solvente extrator satisfatório deve apresentar as seguintes características: densidade maior que a da água, para permitir a formação da fase sedimentada; baixa solubilidade na fase aquosa, para permitir a separação adequada do extrato orgânico; não-volátil durante o processo de extração; ser compatível com o instrumento analítico utilizado para quantificação do analito e solubilidade adequada para o analito de interesse (BORGES, 2015). Os solventes halogenados como clorofórmio, diclorometano, tetracloroetileno e tetracloreto de carbono estão entre os mais utilizados em DLLME por apresentarem as características descritas anteriormente (MOREIRA *et al.*, 2014).

Diante disso, neste trabalho foram analisados os seguintes possíveis solventes extratores: clorofórmio, 1,2-dicloroetano, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno. Algumas de suas características físico-químicas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos solventes avaliados na otimização do método. Fonte: Merck, 2013; CETESB, 2015.

Solvente	Densidade (g/cm ³ , 20°C)	Solubilidade em água (g L ⁻¹ , 20°C)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C, 1013 hPa)	Pressão de Vapor (mmHg, 20°C)
EXTRATORES					
Clorofórmio (CHCl ₃)	1,47	8	-63	61	158
1,2-Dicloroetano (C ₂ H ₄ CL ₂)	1,25	8,7	-35,5	83,5-84,1	65
Tetracloroeto de Carbono (CCl ₄)	1,59	0,8	-23	76,7	90
Tetracloroetileno (C ₂ Cl ₄)	1,63	0,165	-19	121	13
DISPERSORES					
Acetona (C ₃ H ₆ O)	0,79	Solúvel	-95,4	56,2	175
Acetonitrila (ACN)	0,786	Solúvel	-45,7	81,6	73
Metanol (MeOH)	0,79	Solúvel	-98	64,5	96

Na otimização do método desenvolvido, foi utilizada a proporção de 9:1 de solvente dispersor (ACN) e extrator, em triplicatas.

Dentre os solventes extratores avaliados, o clorofórmio apresentou maior recuperação e menor dispersão de valores, conforme pode ser observado na Figura 8. Este fato pode ser devido à maior solubilidade da TQ em clorofórmio, permitindo maior extração em relação aos outros solventes avaliados. Portanto, clorofórmio foi o solvente selecionado para as análises posteriores.

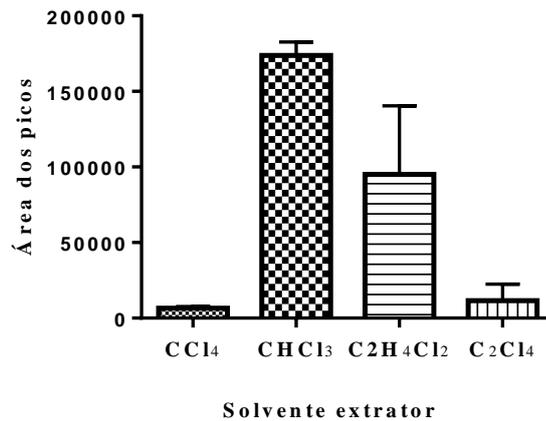


Figura 8. Seleção do solvente extrator na DLLME da TQ em plasma humano.

5.3.1.2 Solvente dispersor

O solvente dispersor ideal em DLLME deve apresentar solubilidade adequada tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa, para permitir a formação de microgotas e aumentar a recuperação da extração. Foram avaliados três tipos de solventes: acetonitrila, metanol e acetona (características físico-químicas listadas na Tabela 3).

Os resultados mostraram extração maior com acetonitrila, o que sugere maior compatibilidade deste solvente com a fase aquosa e consequente maior formação de microgotas, aumentando a superfície de contato do solvente extrator com o analito. Os resultados podem ser melhor observados na Figura 9.

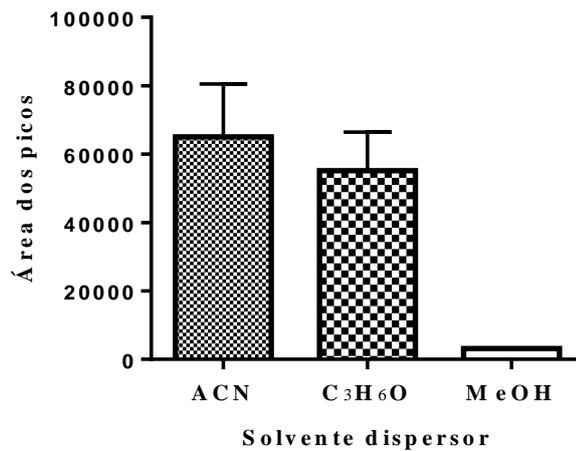


Figura 9. Seleção do solvente dispersor na DLLME da TQ em plasma humano.

Pode-se observar, também, que não houve a formação de precipitado quando se utilizou metanol como solvente dispersor em duas amostras, o que provavelmente foi causado pela alta solubilidade deste solvente em água.

Portanto, acetonitrila foi o solvente dispersor escolhido após a otimização do método e, portanto, utilizado para as análises posteriores.

5.3.1.3 Volume de solvente extrator

Em geral, em DLLME utiliza-se a mistura de 10 a 500 μ L de solvente extrator e 0,5 a 2 mL de solvente dispersor para um volume de 5 a 10 mL de amostra (BORGES *et al.*, 2015). Utilizamos 1 mL da mistura de solventes para aproximadamente 5 mL de fase aquosa.

Na mistura de solventes, testamos a proporção de 9:1, 8:2 e 7:3 de solvente dispersor:extrator e verificamos que a maior extração foi observada com 3 mL de CHCl_3 (7:3), conforme pode ser observado na Figura 9.

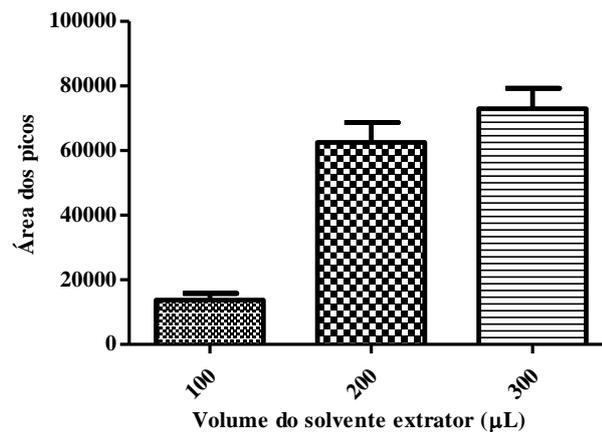


Figura 10. Seleção do volume de solvente extrator na DLLME da TQ em plasma humano.

5.3.1.4 pH

O pH da amostra é um parâmetro importante nas técnicas na partição do analito entre as fases aquosa-orgânica, como é o caso da DLLME. Este fator é otimizado em função da acidez ou basicidade dos compostos, em geral, compostos ácidos normalmente requerem uma acidificação da amostra para permanecerem na forma molecular e facilitar a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator (CASAS *et al.*, 2011), e o inverso acontece com os compostos básicos. Sendo a TQ um composto de caráter básico ($pK_a = 10,20$), espera-se que um meio mais alcalino resulte em maior recuperação no método.

Foi avaliada a adição de 3 volumes diferentes de solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (50, 100 e 200 μL), para observar a influência do pH na extração. Foram obtidos os seguintes resultados, conforme a Figura 11:

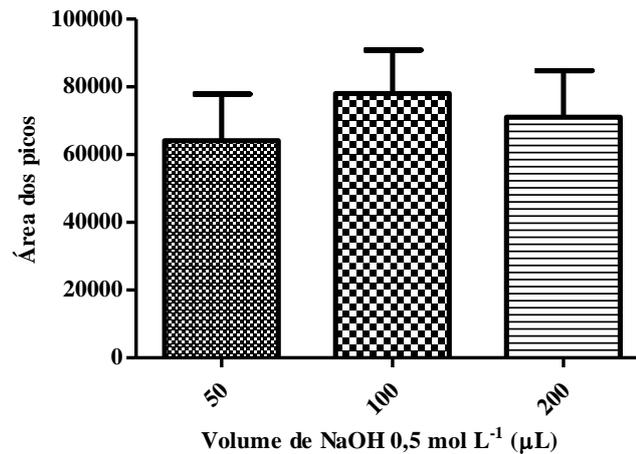


Figura 11. Seleção do volume da solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ adicionada na DLLME da TQ em plasma humano.

Observou-se então que a adição de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ não alterou significativamente a recuperação da TQ. Definiu-se, portanto, o volume de 100 µL para as etapas posteriores da otimização, o qual resultou em pH de 6,5 a 23°C.

5.3.1.5 Tempo de extração

Na técnica de DLLME, onde se utiliza um solvente dispersor solúvel na fase aquosa em conjunto com um solvente extrator insolúvel, durante a etapa de extração o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas extraíndo os analitos. Nesse momento, forma-se uma grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo, sendo essa a principal vantagem da técnica de DLLME (BORGES *et al.*, 2015).

Foram avaliados os tempos de extração de 1, 2 e 3 minutos, e não foi obtida diferença significativa nas áreas dos picos, resultado já esperado em DLLME. No entanto, maior erro foi verificado em 2 e 3 minutos, sendo definido, portanto, o tempo de extração de 1 minuto para aumentar o poder de processamento do método.

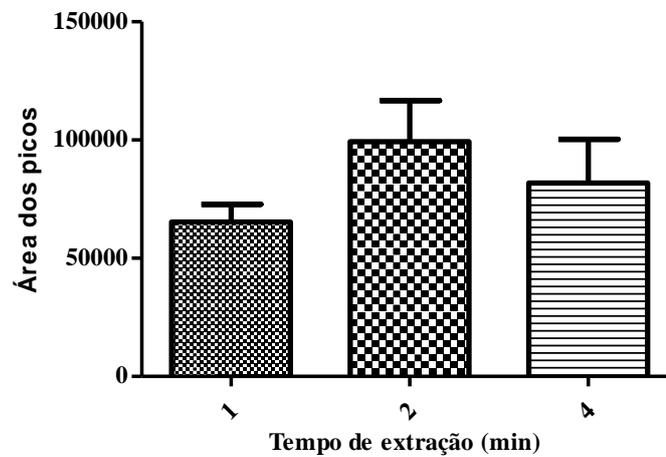


Figura 12. Média das áreas dos picos na definição do tempo de extração do método para determinar tafenoquina em plasma humano.

Diante disso, as condições cromatográficas otimizadas foram: solvente dispersor ACN, solvente extrator CHCl_3 , $\text{ACN}:\text{CHCl}_3$ (7:3, v/v), 100 μL de solução de NaOH 0,5 mol L^{-1} e tempo de extração de 1 minuto.

5.3.2 Validação

5.3.2.1 Seletividade

Segundo as agências regulamentadoras, é recomendado a avaliação de, no mínimo, 6 amostras isentas do analito (amostras branco) e comparadas com amostras contendo TQ na concentração referente ao LIQ. Devem-se observar possíveis interferentes eluindo no tempo de retenção da TQ, que podem incluir impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz. A seletividade do método proposto foi satisfatória, uma vez que não foram observados picos interferentes no TR da TQ nos brancos realizados, conforme pode ser observado na figura 12.

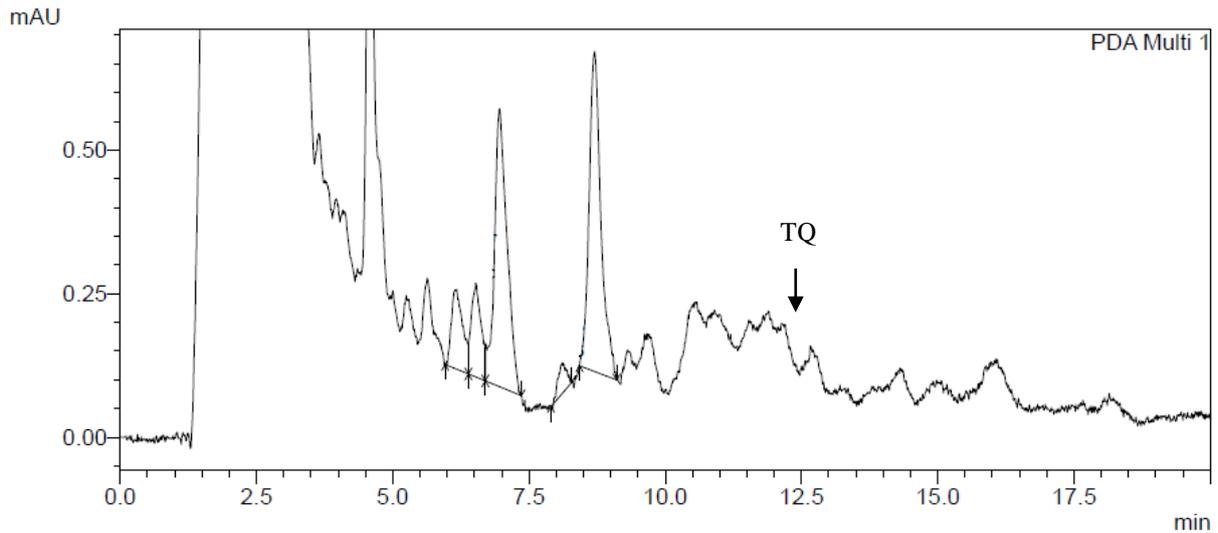


Figura 13. Cromatograma referente ao plasma branco para verificação da seletividade do método para determinar TQ em plasma humano.

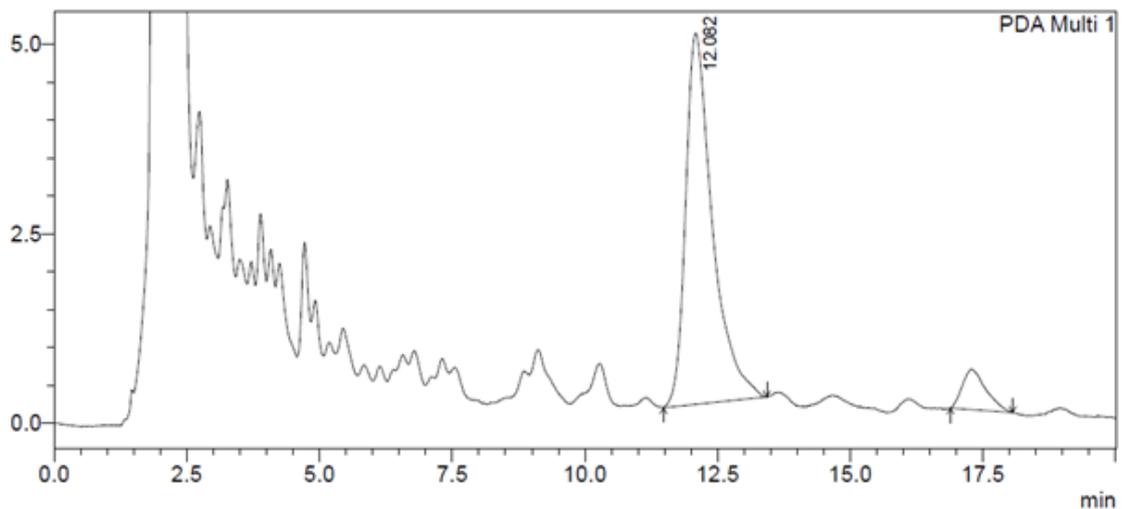


Figura 14. Cromatograma referente ao plasma fortificado com TQ na concentração de 1250 ng mL⁻¹.

5.3.2.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foi feita uma curva de calibração abrangendo as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 500, 1000 e 1500 ng de TQ por mL de plasma, total de 6 concentrações, conforme recomendações do FDA (2001). As concentrações foram definidas com base em trabalhos anteriores que verificaram a concentração atingida pela TQ em plasma humano e outros de desenvolvimento de métodos para quantificação de TQ em plasma humano.

Os resultados obtidos evidenciam curva de calibração satisfatória no intervalo de concentrações plasmáticas selecionado, uma vez que se obteve coeficiente de determinação (r^2) $> 0,99$ e os desvios padrões mantiveram-se abaixo de 15% em todas as concentrações avaliadas (Fig. 15).

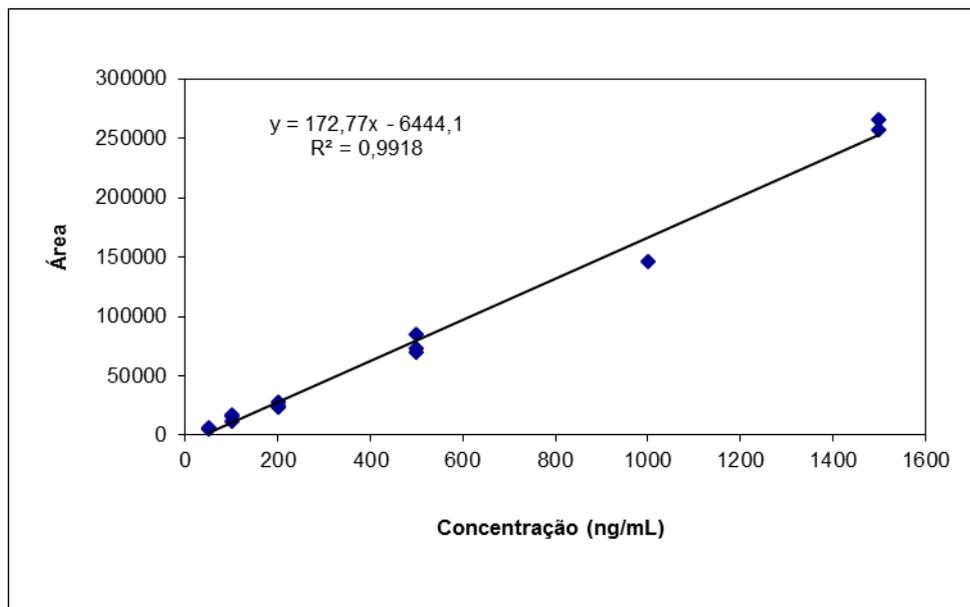


Figura 15. Regressão linear da curva analítica obtida para a TQ no intervalo de concentração plasmática de 50 a 1500 ng mL^{-1} , segundo o método proposto.

5.3.2.3 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ é definido como a menor concentração de um composto que pode ser medida com uma precisão especificada, dentro do critério de aceitação do método (CASS & DEGANI, 2001). Geralmente, o LIQ é o menor ponto da curva de calibração. Para o método proposto, a menor concentração avaliada da TQ foi de 50 ng mL^{-1} , com valores de desvio padrão relativo de 14,9% e erro relativo inferior a 20% (Tabela 4).

Tabela 4. Limite Inferior de quantificação do método desenvolvido para determinação da TQ em plasma humano.

Concentração obtida (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Erro relativo (%)
40,3	14,9	-19,4

análises em quintuplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

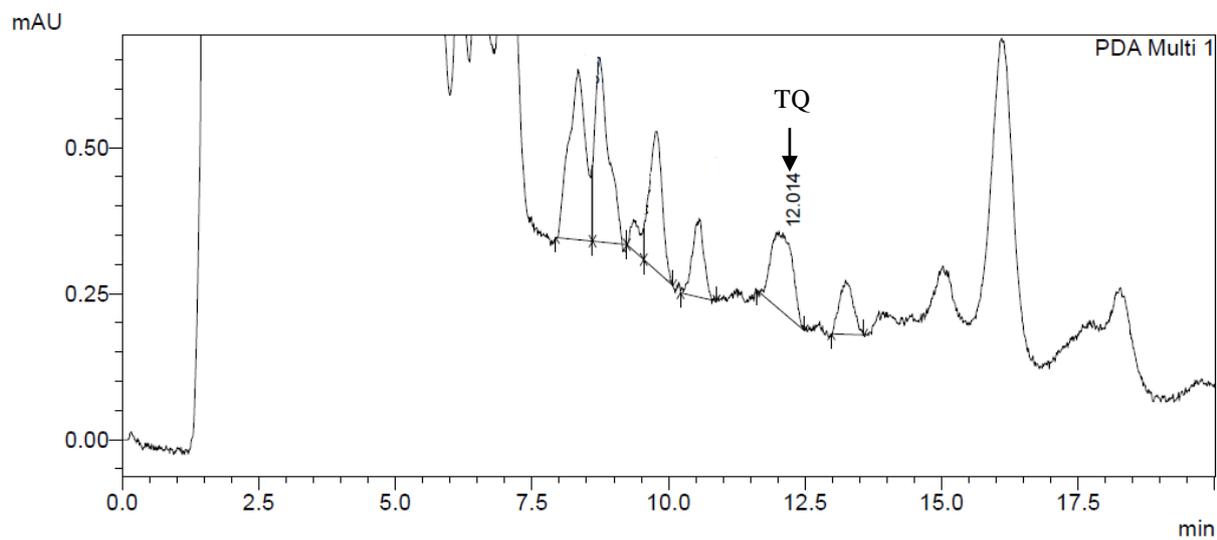


Figura 16. Cromatograma referente ao plasma fortificado com TQ na concentração referente ao LIQ, para verificação da seletividade do método para determinar TQ em plasma humano.

Embora o LIQ obtido seja superior a outros métodos descritos na literatura, os ensaios existentes empregaram técnicas de detecção mais sensíveis e menos acessíveis em um laboratório de rotina. No entanto, acredita-se que este método pode ser empregado em estudos farmacocinéticos.

5.3.2.4 Precisão e exatidão

A Tabela 5 mostra os valores obtidos de precisão e exatidão para o método proposto. Observa-se alta precisão e exatidão, uma vez que os valores de erro relativo e desvio padrão relativo foram menores que 15%, aceitáveis para análises de fármacos em fluidos biológicos.

Tabela 6. Precisão e exatidão do método desenvolvido para determinação da TQ em plasma humano.

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração obtida (ng mL ⁻¹)	Exatidão ^a	Precisão ^b
Intra-ensaio ^c			
150	135,1	-9,9	13,1
600	653,4	8,9	9,5
1200	1340,4	11,7	8,6
Interensaios ^e			
150	130,8	-12,8	7,5
600	689,4	14,9	12,8
1200	1358,4	13,2	13,5

^aerro relativo (%); ^bdesvio padrão relativo (%); ^cquintuplicata para cada concentração; ^danálises em três dias consecutivos.

5.3.2.5 Recuperação

O método apresentou boa recuperação, com valor de recuperação média de 78,3%, conforme pode ser observado na tabela 7. Os valores de desvio padrão relativo indicam boa repetibilidade do procedimento de extração para amostras fortificadas. Tais resultados confirmam uma das vantagens da técnica de DLLME, que é a alta recuperação (MOREIRA *et al.*, 2014). Além disso, o método apresentou recuperação maior que outros de quantificação da TQ em plasma, como o de ROMSING *et al.* (2011), onde foram obtidos valores de 60% de recuperação.

Tabela 7. Recuperação absoluta do método desenvolvido para determinação da TQ em plasma humano.

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
150	67,8	10,5
750	83,1	9,8
1250	84,1	7,7
Intervalo (150-1250)	78,3	9,3

análises em triplicata; RSD: desvio-padrão relativo.

5.3.2.6 Estabilidade

De acordo com a Tabela 8, pode-se observar que a TQ foi estável tanto quando exposta à temperatura ambiente quanto em ciclos de congelamento e descongelamento, com valores de $p > 0,05$, corroborando o trabalho de Romsing *et al.* (2011), que fez o mesmo estudo e o trabalho de Karle *et al.* (1995), que relatou estabilidade de TQ em plasma humano durante cerca de 4 meses a -20°C . De qualquer forma, sabendo-se que alguns fármacos antimaláricos apresentam instabilidade quando expostos à luz, protegeu-se as amostras e as soluções-padrão durante o desenvolvimento e validação do método, cobrindo-se com papel alumínio os tubos e frascos que as continham.

Tabela 8. Estabilidade da TQ em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e após estocagem à temperatura ambiente.

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Valores de p ^a
Ciclos de congelamento e descongelamento	
150	0,47
1250	0,06
Estocagem à temperatura ambiente	
150	0,42
1250	0,5

^aAnálise pelo teste t de Student com nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um método para a quantificação da tafenoquina em plasma humano e, pela primeira vez, foi feito o relato do emprego da Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME) para a análise deste fármaco. Neste estudo, diferentes fatores que influenciam a extração foram testados. O método otimizado foi validado e apresentou boa recuperação e faixa linear que abrange as concentrações observadas em indivíduos em uso de tafenoquina, podendo ser útil para análises de rotina. A simplicidade da técnica e o consumo reduzido de solventes são as principais vantagens deste método.

7. REFERÊNCIAS

- AMINA, Khadjavi; GIRIBALDI, Giuliana; PRATO, Mauro. From control to eradication of malária: the end of being stuck in second gear?. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 412–420. 2010.
- BORGES, Keyller Bastos; FIGUEIREDO, Eduardo Costa de; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Grupo Editorial Nacional-GEN. 2015
- BRASIL, Ministério da Saúde. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE No 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico da malária. 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-009---Mal--ria-para-publica---o.pdf>
- BRUECKNER, R. P.; LASSETER, K. C.; LIN, E. T.; SCHUSTER, B. G. First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58 (5). 1998.
- BRUECKNER, R.P.; COSTER, T.; WESCHE, D. L.; SHMUKLARSKY, M.; SHUSTER, B. Prophylaxis of Plasmodium falciparum infection in a human challenge model with WR 238605, a new 8-aminoquinoline antimalarial. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42(5), p. 1293–1294. 1998.
- BUELTER, E. G6PD deficiency. **Blood Journal**, v.84, p. 3613-3636. 1994
- CASAS, Monica Escolà; HANSEN, Martin; KROGH, Kristine A.; STYRISHAVE, Bjarne; BJORKLUND, Erland. Analytical sample preparation strategies for the determination of antimalarial drugs in human whole blood, plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 962. 2014.
- CASAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617. 2011
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação-Série Apontamentos. São Carlos: EdUFSCar, 2001.
- CHASIN, A. M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S.

Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, n.1, p.1-6. 1998.

DOYLE, E.; FOWLES, S. E.; SUMMERFIELD, S.; WHITE, T. J. Rapid determination of tafenoquine in small volume human plasma samples by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 769. 2002

FRANÇA, Tanos C. C.; SANTOS, Marta G. dos Santos; FIGUEROA-VILLAR, José D. Malária: aspectos históricos e quimioterápia. **Química Nova**, v. 31, n.5. 2008.

HADJMOHAMMADI, Mohammad Reza; GHOREISHI, Seyedeh Saboora. Determination of Estrogens in Water Samples Using Dispersive Liquid Liquid Microextraction and High Performance Liquid Chromatography. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58. 2011.

KARLE, Jean M.; OLMEDA, Raul. Rapid and sensitive quantitative analysis of the new antimalarial N4-[2,6-Dimethoxy-4-methyl-5-[(3-trifluoromethyl) phenoxy]-8-quinolinyl]-1,4-pentanediamine in plasma by liquid chromatography and electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 424. 1988

KARLE, Jean M.; OLMEDA, Raul; FREEMAN, Sandy G.; SCHROEDER, Alan C. Quantification of the individual enantiomer plasma concentrations of the candidate antimalarial agent N4-[2,6-dimethoxy-4-methyl-5-[(3-trifluoromethyl)phenoxy]-8-quinolinyl]-1,4-pentanediamine (WR 238,605). **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 670. 1995.

KOCISKO, D. A.; WAISH, D. S. Eamsila, C.; EDSTEIN, M. D. Measurement of Tafenoquine (WR 238605) in Human Plasma and Venous and Capillary Blood by High-Pressure Liquid Chromatography. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22. 2000.

LLANOS-CUENTAS, Alejandro; LACERDA, Marcus V.; RUEANGWEERAYUT, Ronnatrai; KRUDSOOD, Srivicha; GUPTA, Sandeep K.; KOCHAR, Sanjay K.; ARTHUR, Preetam; CHUENCHOM, Nuttagarn; MOHRLE, Jorg; DUPARC, Stephan; UGWUEGBULAM, Cletus; KLEIN, Jorg-Peter; CARTER, Nick; KELLAM, Lynda. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of Plasmodium vivax malária (detective): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p.1049-1058. 2014.

MOREAU, R. L. M; SIQUEIRA, E. P. B. Ciências Farmacêuticas, Toxicologia Analítica. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2008.

MOREIRA, Bruna Juliana; YOKOYA, Jennifer Michiko Chauca; GAITANI, Cristiane Masetto. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6(3). 2014.

NASVELD, P.; KITCHENER, S.; Treatment of acute malária with tafenoquine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.99, pág. 2-5. 2005

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=11359, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11359> (acessado em: 7 de dezembro, 2015).

NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo W. ALMEIDA. Parasitologia humana. Editora O Atheneu. 11ª edição. São Paulo. 2004.

OJEDA, Catalina Bosch; ROJAS, Fuensanta Sánchez. Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: recent applications. **Chromatographia**, v. 74. 2011.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensis Science International**, v.165, p.216-224. 2007.

PYBUS, Brandon S.; SOUSA, Jason C.; JIN, Xiannu; FERGUSON, James A.; CHRISTIAN, Robert E.; BARNHART, Rebecca; VUONG, Chau; SCIOTTI, Richard J.; REICHARD, Gregory A.; KOZAR, Michael P.; WALKER, Larry A.; OHRT, Colin; MELENDEZ, Victor. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria Journal**, v. 11. 2012.

REZAEI, Mohammad; ASSADI, Yaghoob; HOSSEINI, Mohammad-Reza Milani; AGHAEI, Elham; AHMADI, Fardin; BERIJANI, Sana. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**. 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p 771-780. 2004.

ROMSING, S.; LINDEGARDH, N.; BERGQVIST, Y. Determination of tafenoquine in dried blood spots and plasma using LC and fluorescence detection. **Bioanalysis**, v. 3(16). 2011.

ROSENTHAL, Philip J. Antimalarial Chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug Discovery. Editora Humana Press. New York. 2001.

SWEETMAN, S. Ed. Martindale: The Complete Drug Reference. Pharmaceutical Press. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado, USA. 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTHY AND HUMAN SERVICES – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) – Guidance for industry – Bioanalytical Method Validation. Rockville, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2014. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1