

Determinação estereosseletiva da hidroxicloroquina e seus principais metabólitos em urina por microextração em fase sólida e HPLC

Anderson R. Moraes de Oliveira ¹ (PG)*, Pierina Sueli Bonato ¹ (PQ).

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, anderson@fcfrp.usp.br
Avenida do Café, SN, Ribeirão Preto/SP.

Hidroxicloroquina, metabólitos, SPME, análise enantiosseletiva, HPLC.

Introdução

Microextração em fase sólida (SPME) é uma microtécnica, introduzida por Arthur e Pawliszyn¹ em 1990, em que os processos de extração e pré-concentração dos analitos ocorrem em uma só etapa. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de sílica fundida com a extremidade recoberta com uma fase extratora. Essa técnica é atrativa porque não há o consumo de solventes orgânicos durante os processos de extração. A hidroxicloroquina (HCQ) é um fármaco comercializado como uma mistura racêmica e foi primeiramente utilizada no tratamento da malária e mais recentemente em diversas doenças autoimunes. HCQ passa por um extenso metabolismo oxidativo e três metabólitos quirais são produzidos: desetilcloroquina (DCQ), desetilhidroxicloroquina (DHCQ) e bisdesetilcloroquina. Assim, o objetivo do presente estudo é desenvolver uma metodologia analítica para determinação estereosseletiva da HCQ e seus principais metabólitos (DCQ e DHCQ) em urina humana por SPME e HPLC.

Resultados e Discussão

Otimização do Procedimento de Extração

Diversos parâmetros que pudessem influenciar no processo de extração foram otimizados como: tempo de extração, temperatura de extração, adição de sal, tipo de fibra, tempo de dessorção e “carryover”. Os dados do procedimento otimizado encontram-se na tabela 1.

Tabela 1- Condições estabelecidas para análise da HCQ e seus principais metabólitos por SPME-HPLC

Extração	Dessorção
⇒ Volume de urina: 3000 µL	⇒ Tempo de dessorção: 3 min
⇒ Tempo de extração: 40 min	⇒ Solvente : metanol (100%)
⇒ Fibra: PDMS-DVB 60 µm	⇒ Volume de solvente de dessorção: 100 µL
⇒ T. fosfato 1 mol/L pH 11: 1 mL	⇒ Temperatura: 25° C
⇒ Cloreto de sódio: 10% (m/v)	
⇒ Temperatura: 25° C	

Validação da Metodologia

Após otimização da extração, o método foi validado de acordo com as exigências da literatura para análise de fármacos em fluidos biológicos². Assim, os parâmetros avaliados foram: linearidade,

estabilidade, precisão e exatidão inter e intra-ensaio, recuperação e racemização. Todos os dados avaliados estão de acordo com os recomendados pela literatura. A tabela 2 mostra os dados para linearidade e recuperação do método.

Tabela 2- Valores de linearidade e recuperação do método

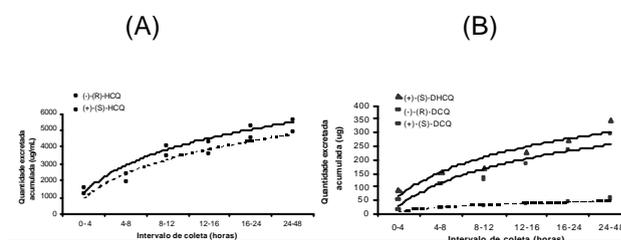
Estereo-isômeros	Recuperação		Linearidade		
	%	CV (%)	Intervalo (ng/mL)	Equação da reta	r
(-)-(R)-HCQ	9,5	3,5	50-1000	y= 0,0024x +0,0317	0,9966
(+)-(S)-HCQ	9,2	3,2	50-1000	y= 0,0023x +0,0013	0,9967
(-)-(R)-DHCQ	8,9	6,6	42-416	y= 0,0008x +0,0051	0,9955
(+)-(S)-DHCQ	9,5	6,7	42-416	y= 0,0008x +0,0051	0,9955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

*CV: Coeficiente de variação

Aplicação do Método

Após validação, o método foi empregado em um estudo piloto de disposição cinética do fármaco. A quantidade excretada acumulada para HCQ, DCQ e DHCQ foi, respectivamente, de 2,6, 0,08 e 0,08% (Fig. 1). A excreção dos enantiômeros parece ser estereosseletiva no tempo estudado. Os dados obtidos corroboram com os dados da literatura.

Figura 1- Gráfico da quantidade excretada acumulada versus intervalo de coleta (A) HCQ; (B) DHCQ e DCQ



Conclusões

A SPME-HPLC mostraram-se eficiente na análise estereosseletiva da HCQ e seus metabólitos em urina. O consumo de solvente orgânico na extração foi muito baixo (100 µL de metanol por extração) comprovando a vantagem do uso da técnica.

Fapesp, Cnpq

¹C. L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145

²ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm.