

## “Avaliação de Colunas de Acesso Restrito Imobilizadas com Albumina Sérica Bovina para Exclusão Protéica de Frações Microssomais”

Katia Roberta A. Belaz (PG)\*, Regina V. Oliveira (PQ)

[robertabelaz@yahoo.com.br](mailto:robertabelaz@yahoo.com.br)

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP

Palavras Chave: fases de acesso restrito (RAM), albendazol, fração microssomal

### Introdução

A análise de fármacos em fluidos biológicos é importante para a compreensão do comportamento farmacocinético e farmacodinâmico desses compostos. No entanto, uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de métodos de análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) reside no desafio em obter uma amostra em condições adequadas para ser analisada.

A amostra deve estar livre de compostos interferentes, os quais além de prejudicarem as análises podem danificar as colunas cromatográficas pela adsorção de proteínas no suporte, ocasionando o comprometimento da performance das colunas. Assim, uma das etapas mais importantes na bioanálise de fármacos, por CLAE, é o pré-tratamento das amostras biológicas.

Dentro deste contexto, as fases de acesso restrito (RAM) têm se destacado por permitirem injeções diretas de biofluidos nos sistemas cromatográficos. Estas fases promovem a exclusão de macromoléculas (proteínas) com retenção seletiva das micromoléculas<sup>1</sup> e foram selecionadas neste trabalho.

### Resultados e Discussão

Uma variedade de colunas de acesso restrito têm sido desenvolvidas e utilizadas para análise de diferentes classes de fármacos em fluidos biológicos por cromatografia multidimensional.

Dentre estas, as fases de acesso restrito recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA), mostraram excelentes resultados para trabalhos realizados no grupo em diferentes matrizes, dentre elas leite, plasma humano e bovino e ovo, com acoplamento das colunas RAM-BSA tanto com colunas analíticas aquirais quanto com colunas quirais.

Com isso, nesse trabalho, quatro fases RAM-BSA foram preparadas com diferentes suportes e avaliadas quanto ao poder de exclusão protéica de frações microssomais obtidas de fígados de ratos,

uma vez que esta abordagem será posteriormente utilizada em um método multidimensional por CLAE, com injeção direta de amostras, no estudo do metabolismo *in vitro* do albendazol.

As colunas RAM-BSA foram preparadas segundo o protocolo descrito por Menezes e Félix.<sup>2</sup> Para a exclusão das proteínas microssomais foram preparadas as colunas RAM-BSA C8, C18, ciano e fenil (5,0 x 0,46 cm) e avaliadas utilizando-se água como fase móvel a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, para diferentes volumes de amostras (50, 100 e 200µL). O método de Bradford<sup>3</sup> foi utilizado para avaliar a eficiência da exclusão das proteínas microssomais pelas colunas extratoras preparadas.

Os resultados mostraram valores percentuais de 93 a 98% para a exclusão protéica, em apenas 5 mim de eluição, em todas as quatro colunas preparadas, independente do suporte empregado, o que demonstra que a escolha da coluna a ser empregada como extratora deverá ser realizada considerando-se a retenção e seletividade para os compostos de interesse.

### Conclusões

Este trabalho demonstrou a eficiência de exclusão das proteínas microssomais pelas colunas RAM-BSA, sem a adição de solventes orgânicos ou de aditivos na fase móvel. Portanto, as colunas avaliadas podem ser usadas indiscriminadamente para a exclusão de proteínas, usando microssomas como matriz, no desenvolvimento do método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Multidimensional.

### Agradecimentos

Os autores agradecem FAPESP, CAPES e CNPq pelas bolsas e suporte financeiro.

<sup>1</sup>Lima, V.V.;Cassiano, N.M.; Cass, Q.B.; *Química Nova*, **2006**, 29(1), 72.

<sup>2</sup>Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.

<sup>3</sup>Menezes, M. L., Félix, G., *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1998**, 21, 2863.