

## Avaliação Sistemática de Colunas de Acesso Restrito Imobilizadas com Proteínas para a Retenção Seletiva de Antibióticos Antituberculose

Marina Denadai<sup>a</sup> (IC), Kátia Roberta Anacleto Belaz (PG)<sup>a</sup>, Regina Vincenzi Oliveira<sup>a</sup> (PQ)\*  
oliveirarv@dq.ufscar.br

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. CP 676 – 13565-905 – São Carlos – S.P.

Palavras Chave: Fases de acesso restrito, antibióticos antituberculose, CLAE

### Introdução

O preparo de amostras para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) continua sendo um desafio, principalmente quando o interesse na análise consiste na determinação quantitativa de fármacos em matrizes complexas, como por exemplo, fluidos biológicos. Com o objetivo de eliminar proteínas e outras macromoléculas, numerosos procedimentos de preparo de amostras têm sido reportados. No entanto, a grande demanda por sistemas automatizados e análises rápidas tem motivado o preparo de amostras *on line*. Dentro deste contexto, colunas de acesso restrito imobilizadas com proteínas séricas bovinas (RAM-BSA) têm sido eficientemente empregadas na determinação de fármacos em diversos fluidos biológicos<sup>1</sup> e, desta forma, foram selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho.

### Resultados e Discussão

As fases de acesso restrito (RAM) são suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de amostras biológicas sem ocasionar perda da eficiência das colunas cromatográficas. O mecanismo de ação destes suportes baseia-se na exclusão de macromoléculas e retenção das micromoléculas de interesse<sup>1</sup>. Uma variedade de colunas de acesso restrito tem sido utilizada na análise de diferentes classes de fármacos em biofluidos, por cromatografia multidimensional, onde a etapa inicial consiste em avaliar a fase móvel adequada para a retenção seletiva dos analitos de interesse e posterior transferência destes para a coluna analítica.

Neste trabalho foram selecionadas quatro colunas do tipo RAM-BSA para avaliação das suas capacidades retensivas para os antibióticos pirazinamida, isoniazida e rifampicina, sendo essas: RAM-BSA C8, C18, fenil e ciano. As colunas foram preparadas por cromatografia frontal<sup>2</sup>. Os antibióticos foram selecionados por serem administrados no tratamento da tuberculose e alvo de futuros trabalhos no grupo.

O trabalho avaliou o desempenho das colunas RAM-BSA utilizando água ou solução tampão fosfato em diferentes valores de pH (2,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; e 8,0) como fases móveis, a 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e 254 nm.

Devido à capacidade de ionização dos antibióticos analisados, uma retenção muito pequena para os compostos foi obtida quando água foi utilizada como fase móvel. No entanto, a utilização de solução tampão fosfato, em diferentes valores de pH, propiciou retenções modestamente maiores, provavelmente devido à supressão da ionização de grupos funcionais pertencentes às moléculas.

Para a análise da rifampicina nas colunas RAM-BSA C8 e C18 foi necessário a adição de modificador orgânico (acetonitrila ou metanol) na fase móvel, devido a sua elevada retenção nestas colunas. O uso de acetonitrila (30% v/v) proporcionou uma maior capacidade retensiva quando pH 2,5 foi utilizado. Com metanol (60% v/v) o maior tempo de retenção foi obtido com tampão pH 6,5. Em ambas as colunas, os melhores resultados foram obtidos com valores de pH elevados, entre 6,5 e 7,5, demonstrando a influencia do pH na retenção da rifampicina.

### Conclusões

As colunas RAM-BSA preparadas mostraram resultados satisfatórios na retenção dos fármacos antituberculose e podem ser empregadas no desenvolvimento de métodos cromatográficos multidimensionais como colunas extratoras. A avaliação sistematizada realizada nas colunas RAM-BSA mostrou que o pH da fase móvel e o modificador orgânico influenciam na retenção dos antibióticos e devem ser investigados.

### Agradecimentos

FAPESP e CNPq.

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

<sup>2</sup>Menezes, M. L., Félix, G., *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1998**, 21, 2863.