

COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE IVERMECTINA EM PLASMA BOVINO PARA ANÁLISE POR CLAE/FL UTILIZANDO LIOFILIZAÇÃO E SPE

Deborah M.V.C. Medeiros (IC)^{1*}, Thais P. Ferreira (IC)¹, Viviane S. Magalhães(PG)¹, Yara P. Cid(PG)¹, André L.M. Albert(PQ)¹, Fabio B. Scott(PQ)²

1-Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, UFRRJ; 2- INCQS, FioCruz,

deby_medeiros@hotmail.com

Palavras Chave: macrolactonas, HPLC, matriz biológica

Introdução

A ivermectina pertence à classe das macrolactonas e possui um amplo espectro de ação sendo largamente utilizada no combate de endo e ectoparasitas com grande sucesso comercial no setor agropecuário². A análise de ivermectina em fluidos biológicos é importante para a quantificação de resíduos e estudos de biodisponibilidade em animais. Matrizes de origem biológica são ricas em proteínas, carboidratos e lipídeos, componentes que podem interferir nas análises, além de diminuir a vida útil das colunas cromatográficas. A extração em fase sólida (SPE) é um dos métodos mais comumente utilizados para extração de amostras em plasma. Diversos trabalhos já foram descritos utilizando esta metodologia. A liofilização é um processo de desidratação envolvendo o congelamento e a retirada de água por sublimação. Este tem a vantagem de conservar o material por longos períodos de tempo. O objetivo do presente estudo foi comparar a extração de ivermectina em plasma bovino utilizando liofilização e SPE no preparo de amostras para quantificação por CLAE com detecção por fluorescência. As amostras foram preparadas a partir de sangue bovino coletado em tubos heparinizados e levados a centrifugação para separação do plasma. O plasma foi contaminado com solução de ivermectina na faixa de concentração de 0,5 a 200 ppb. Para extração por SPE foram utilizados cartuchos C18 e metanol como eluente. Para liofilização foi realizado um ciclo à -40°C com posterior extração utilizando acetonitrila. As amostras foram analisadas por CLAE com as seguintes condições cromatográficas: coluna Sunfire – C18 (5µm) 150 x 4,6 mm; Fase móvel: metanol: água (99:1, v/v); λ excitação: 360 nm; λ emissão: 480 nm; Fluxo: 1,0 mL/min; Temperatura: 27°C; Tempo de corrida: 12 minutos. A metodologia desenvolvida foi avaliada através dos parâmetros de linearidade, precisão, recuperação, limite de quantificação e limite de detecção segundo os critérios de aceitação descritos na RE n°899 (ANVISA)¹.

Os resultados demonstraram que o derivado fluorescente obteve estabilidade de 24 horas com parâmetros cromatográficos aceitáveis. As curvas analíticas do padrão, do liofilizado e do SPE mostraram-se lineares ($r > 0,99$) nas faixas de 0,5-150ppb; 0,5-125ppb e 1-150ppb respectivamente. O método de liofilização apresentou valores de recuperação maiores quando comparados ao método utilizando SPE. Os resultados de recuperação para os níveis de concentração de 0,5; 50 e 100ppb mostraram valores de 113, 120 e 100% para liofilização e 125, 91 e 77% para SPE respectivamente. A análise estatística foi feita utilizando o programa Biostat 5.0 e apresentou diferença significativa para todos os níveis de concentração testados na recuperação.

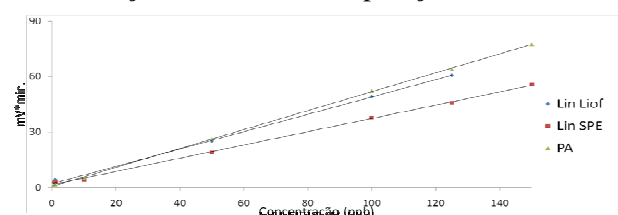


Figura 1. – Curvas analíticas de IVE padrão analítico (PA), IVE em plasma liofilizado (Lin liof) e IVE em plasma SPE (Lin SPE).

Conclusões

A liofilização apresenta vantagens ao método do SPE pois envolve um número reduzido de etapas levando a uma maior recuperação do analito. Esta técnica pode ser uma nova alternativa para o preparo de amostras biológicas.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq, INCQS e FAPUR pelas bolsas e apoio concedidos

¹ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003 Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, D.O.U. 02/06/2003

² Danaher M., Howells L. C., Crooks S. R.H., Flajs V. C., O'Keeffe M., J. Chromatogr. B, 2006, 844, 175

Resultados e Discussão