

## DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DE MEIOS DE ACESSO RESTRITO PROTEÍNA-IMOBILIZADA E SUAS AVALIAÇÕES PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS COM INJEÇÃO DIRETA DE PLASMA HUMANO

Virgínia Veronica de Lima, Neila Maria Cassiano e Quezia Bezerra Cass\*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP

Recebido em 6/1/05; aceito em 25/4/05; publicado na web em 24/8/05

DEVELOPMENT OF RESTRICTED-ACCESS MEDIA CHROMATOGRAPHIC COLUMNS PROTEIN-IMMOBILIZED AND THEIR EVALUATION FOR THE ANALYSIS OF DRUGS BY DIRECT INJECTION OF HUMAN PLASMA. A series of bovine serum albumin-immobilized supports have been prepared and used as restricted access media (RAM) columns. Restricted-access supports combine size-exclusion of proteins and other high-molar-mass matrix components with the simultaneous enrichment of low-molar mass analytes. These characteristics were chromatographically evaluated for the columns. The RAM-BSA (Bovine Serum Albumin) columns showed excellent performance for exclusion of human plasma protein with good retention capacity for a series of acidic, basic, and neutral drugs.

Keywords: RAM column; direct injection; plasma samples.

### INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica amplamente utilizada na análise de xenobióticos em fluidos biológicos. No entanto, amostras de matrizes biológicas não devem ser diretamente injetadas nas fases cromatográficas, uma vez que as proteínas presentes nestes tipos de matrizes (soro, plasma, urina, leite, etc) provocam rápido entupimento da coluna e perda da eficiência cromatográfica, devido à sua adsorção acumulativa no suporte. Para evitar a rápida deterioração das colunas, antes da análise cromatográfica é necessário realizar um pré-tratamento nas amostras biológicas. Este pré-tratamento permite a remoção das proteínas e dos interferentes endógenos e/ou a pré-concentração dos analitos, proporcionando um aumento na seletividade e sensibilidade do método<sup>1-3</sup>.

Entre as técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de substâncias presentes em fluidos biológicos destacam-se extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas ou líquidas.

Atualmente, devido ao grande número de amostras usualmente manuseadas nas análises, o procedimento de preparo das mesmas deve ser rápido e conveniente, com perdas mínimas dos analitos e baixo custo de análise. Neste sentido, técnicas de injeção direta de amostra têm sido exploradas uma vez que eliminam os erros humanos de manipulação, minimizam as perdas dos analitos, evitam o manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumentam, significativamente, o número de análises por tempo<sup>4,5</sup>.

Dentre as técnicas de injeção direta, as que utilizam fases do tipo RAM ("Restricted-Access Media") têm se destacado<sup>4,5</sup>. Estas fases estacionárias combinam os princípios da Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa, uma vez que sua superfície hidrofílica impede a adsorção de macromoléculas da matriz biológica na fase estacionária e suas propriedades hidrofóbicas são responsáveis pela retenção das micromoléculas (Figura 1)<sup>6-11</sup>.

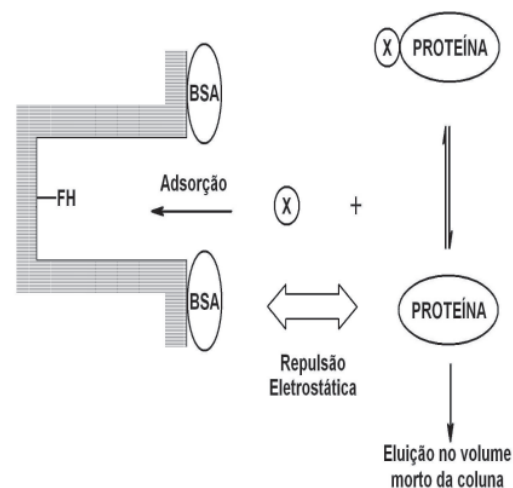


Figura 1. Esquema representando a exclusão de proteínas e retenção das micromoléculas nas fases hidrofóbicas RAM-BSA. FH: Fase Hidrofóbica; BSA: Albumina Sérica Bovina e X: Xenobiótico

Dentre os diversos tipos de suportes cromatográficos, as fases hidrofóbicas proteína-imobilizadas<sup>6</sup>, ISRP ("Internal Surface Reversed-Phase", GFF® II - Regis Technologies)<sup>7</sup>, SPS® ("Semi-Permeable Surface", Regis Technologies)<sup>8</sup>, SHP ("Shielded Hydrophobic Phases", Hisep® - Supelco)<sup>12</sup> e ADS ("Alkyl-Diol Sílica", LiChrospher® ADS - Merck Alemã)<sup>13</sup>, disponíveis comercialmente ou de fácil preparo em laboratório, têm sido usadas para análises de xenobióticos em fluidos biológicos.

As fases RAM têm aplicação analítica muito versátil, podendo ser utilizadas tanto no modo simples de análise como no modo multidimensional. No primeiro caso, a amostra biológica não tratada é injetada diretamente na coluna e, após exclusão das macromoléculas, os xenobióticos são analisados por eluição gradiente<sup>14</sup>. Na cromatografia multidimensional, a coluna RAM é usada como pré-coluna e, após a eluição das macromoléculas, os analitos são transferidos para uma coluna analítica, utilizando-se uma válvula de comutação, onde são separados e analisados<sup>14-16</sup>.

\*e-mail: quezia@dq.ufscar.br

Neste contexto, quatro colunas RAM-BSA ("Bovine Serum Albumin") foram preparadas e avaliadas quanto à capacidade de exclusão das proteínas do plasma e de retenção para uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros. Este trabalho apresenta os resultados obtidos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Generalidades

Os seguintes sistemas cromatográficos foram utilizados: **Sistema 1:** cromatógrafo líquido composto por uma bomba Waters 510 (Milford, USA), um injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, USA) e um detector de ultravioleta Waters 481 acoplados a uma interface Shimadzu CBM 10A (Kyoto, Japan) e **Sistema 2:** cromatógrafo líquido composto por duas bombas Shimadzu LC 10ADvp, uma válvula seletora de solvente Shimadzu FCV-10AL, um auto-injetor Shimadzu SIL 10ADvp, uma válvula de seis caminhos Valco Nitronic 7000 EA (St Louis, USA) e um detector de ultravioleta Shimadzu SPD-10Av acoplados a uma interface Shimadzu SCL 10 Avp.

As colunas de fases estacionárias hidrofóbicas foram empacotadas em uma empacotadora Shandon. A imobilização da albumina sérica bovina nas fases hidrofóbicas e a avaliação da exclusão das proteínas do plasma pelas colunas RAM-BSA foram realizadas no sistema 1 e a avaliação da capacidade de retenção das micromoléculas nas colunas RAM-BSA, no sistema 2.

As medidas de absorção molecular na região do UV-visível foram realizadas em um espectrofotômetro HP 8452A (Avondale, USA) utilizando-se uma cubeta de vidro de 10 mm de caminho óptico.

Os solventes (grau HPLC) utilizados nas análises cromatográficas foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany) ou Mallinckrodt Baker (St. Louis, USA). A água utilizada no preparo das soluções foi purificada em um sistema MILLI-Q® (Millipore, Ribeirão Preto, SP).

Os reagentes e outros produtos químicos foram obtidos de diferentes fontes: albumina sérica bovina, Sigma (fração V, St. Louis, USA), glutaraldeído, di-hidrogenofosfato de potássio e glutaraldeído, Merck (Darmstadt, Germany) e corante azul brilhante de Coomassie, Mallinckrodt (St. Louis, USA).

Os seguintes fármacos foram avaliados: Betaxolol (doador pela Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, SP), Atenolol, Metoprolol e Propranolol (doados pela AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP), Modafinil (doador pelo Laboratoire L. Lafon, Maisons, France), Lansoprazol (doador pela Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP), Pantoprazol (doador pela BYK Química e Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP), Omeprazol (doador pela Libbs Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP), Cetoprofeno e Ibuprofeno (doados pela Aventis-Pharma Ltda, São Paulo, SP), Flurbiprofeno (doador pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP), Verapamil (doador pela Sanval Comércio e Indústria Ltda, São Paulo, SP), Tramisol (doador pela Janssen-Cilag Farmacêutica, São Paulo, SP) e Cetamina comprado da Sigma (St. Louis, USA).

O plasma humano utilizado neste estudo foi fornecido pelo Hemonúcleo Regional do Hospital Universitário São Francisco, Bragança Paulista, SP.

### Preparo das colunas RAM-BSA

As colunas RAM do tipo hidrofóbica imobilizada com albumina sérica bovina (RAM-C<sub>8</sub>-BSA, RAM-C<sub>18</sub>-BSA, RAM-Ph-BSA e RAM-CN-BSA) foram preparadas segundo o procedi-

mento descrito na literatura<sup>17</sup>: 1,5 g das fases hidrofóbicas octil-sílica (C<sub>8</sub> (2) Luna®, 10 µm e 100 Å), octadecil-sílica (Hypersil®, 10 µm e 120 Å), sílica fenil (Hypersil®, 5 µm e 120 Å) e sílica ciano (Nucleosil®, 10 µm e 100 Å) foram suspensas em 50 mL de metanol, sonicadas durante 3 min e empacotadas em colunas de aço inoxidável (10 x 0,46 cm D.I. ou 4,0 x 0,46 cm D.I.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. Em seguida, as colunas foram condicionadas em metanol, durante 4 h, a uma vazão de 1,0 mL/min.

A imobilização da BSA foi realizada *in situ*, por Cromatografia Frontal, de acordo com o procedimento descrito por Menezes e Félix<sup>18</sup>. As colunas foram eluídas, a uma vazão de 1,0 mL/min, com solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mol/L (pH=6,0) durante 20 min, solução de albumina sérica bovina 2,0 mg/mL (preparada em solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mol/L, pH=6,0) durante 30 min (20 min para a coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA de 4,0 x 0,46 cm D.I.), água deionizada durante 20 min e duas porções de 10 mL de glutaraldeído a 25%. Após um repouso de 5 h, as colunas foram eluídas com solução de NaBH<sub>4</sub> 1,0 mg/mL até o eluato apresentar pH 10 e, após mais 2 h em repouso, as fases estacionárias foram lavadas com água deionizada durante 1 h. As fases estacionárias foram mantidas em água e as colunas armazenadas na geladeira, a 4 °C, após o preparo e uso.

### Avaliação da exclusão das proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA

#### Preparo do reagente de Bradford

A solução do corante azul brilhante de Coomassie (reagente de Bradford) foi preparada na concentração de 100 mg/L, segundo o procedimento descrito por Bradford<sup>19</sup>. Em um béquer dissolveu-se 50,0 mg do corante em 25 mL de etanol e, em seguida, acrescentou-se 50 mL de ácido fosfórico 85%. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução do corante foi armazenada, em frasco de vidro âmbar, na geladeira a 4 °C.

#### Preparo das amostras

O plasma humano foi centrifugado, à temperatura ambiente, a 5.000 rpm durante 15 min. Após o condicionamento das colunas RAM-BSA com água a 1,0 mL/min durante 30 min, injetou-se 50 µL de plasma humano, eluiu-se com água e coletou-se frações de 2,0 e/ou 5,0 mL em balões volumétricos. Em seguida, as colunas foram eluídas, a 1,0 mL/min, com água por 10 min e acetonitrila por 30 min para eluição dos compostos endógenos e, em seguida, condicionadas com água por 30 min. Este procedimento foi repetido, em triplicata, para volumes de injeção de 100 e 200 µL de plasma humano. As frações coletadas foram transferidas para frascos de vidros âmbar, armazenadas na geladeira a 4 °C e analisadas no máximo até 12 h após a coleta.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200 µL de plasma humano em balões volumétricos de 2,0 e/ou 5,0 mL e completando-se o volume em água deionizada. As soluções foram armazenadas, em frascos de vidro âmbar, na geladeira a 4 °C.

#### Medidas espectrofotométricas

Pipetou-se 500 µL das amostras eluídas das colunas RAM-BSA, adicionou-se 5,0 mL da solução do corante azul brilhante e deixou-se reagir por 3 min. As amostras de 2 mL e respectivas soluções de referência, após os 3 min de complexação com o reagente de Bradford, foram diluídas com 5 mL de água. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o

espectro na região de 190 a 800 nm. As absorvâncias foram medidas no comprimento de onda de 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante<sup>20</sup>. O mesmo procedimento foi repetido para as soluções de referência.

A eficiência de extração das proteínas do plasma em cada coluna foi calculada comparando-se as absorvâncias das amostras coletadas e as absorvâncias das soluções de referência, que fornecem a quantidade total de proteínas presentes no plasma (100%).

#### Avaliação da retenção das micromoléculas pelas colunas RAM-BSA

Soluções estoques dos fármacos foram preparadas, em metanol, na concentração de 100 µg/mL e a partir destas soluções foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 20 µg/mL. Alíquotas de 200 µL das soluções analíticas foram colocadas em tubos de ensaios e o solvente evaporado, sob fluxo de ar comprimido. Os analitos foram reconstituídos com 200 µL de fase móvel, a solução foi agitada em vórtex por 10 s e, então, 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico 2.

O fator de retenção ( $k$ ) dos fármacos foi mensurado utilizando-se a equação  $k = (t_R - t_0)/t_0$  e o fator de assimetria ( $A_s$ ) foi calculado a 10% da altura da banda cromatográfica<sup>21</sup>. O tempo morto ( $t_0$ ) foi medido usando-se acetonitrila. As condições cromatográficas foram fase móvel: acetonitrila:solução de di-hidrogenofosfato de potássio 10 mmol/L; pH 2,5; 6,0; 6,5 e 7,0, (40:60 v/v) e vazão de 1,0 mL/min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colunas RAM proteína-imobilizada preparadas com BSA<sup>6</sup>, avidina<sup>22</sup> e AGP ( $\alpha$ -1-glicoproteína)<sup>23</sup> têm sido utilizadas com sucesso na análise de xenobióticos em leite<sup>18,24</sup>, plasma<sup>20,25,26</sup>, saliva<sup>27</sup> e tecidos biológicos<sup>28,29</sup>. Como a albumina sérica bovina se encontra disponível comercialmente a um custo relativamente baixo e suas propriedades físico-químicas permitem a utilização em várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma vantagem quando se trabalha com injeção direta de amostras biológicas, esta proteína foi usada no preparo das colunas RAM avaliadas.

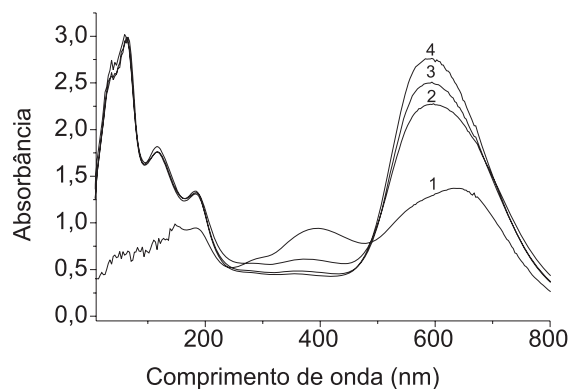
A fase hidrofóbica utilizada no preparo das colunas RAM-BSA influencia na retenção das micromoléculas. As fases C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> têm sido utilizadas no preparo de diferentes colunas RAM<sup>10,11</sup> porém, diferentes interações podem ser conseguidas com as fases fenil e ciano. Assim, pela primeira vez descrevemos o uso dessas fases de sílica no preparo de colunas RAM-BSA.

#### Avaliação da exclusão das proteínas do plasma humano

Para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas pelas colunas RAM-BSA, alíquotas de 50, 100 e 200 µL de plasma humano foram eluídas, com água a 1,0 mL/min durante 5 min<sup>17,20,25,26</sup>.

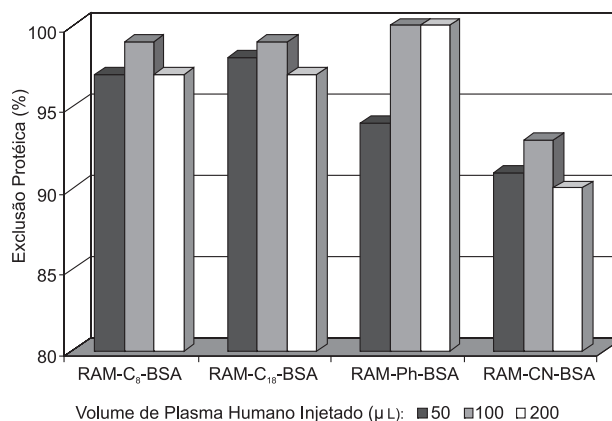
As proteínas eluídas foram complexadas com o corante azul brilhante e os espectros de absorção foram registrados na região de 190 a 800 nm. A Figura 2 apresenta o espectro de absorção do corante e do complexo proteína-corante após eluição de 50, 100 e 200 µL de plasma humano pela coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA.

Como pode ser observado, o espectro de absorção do corante apresenta dois picos bem definidos, com máximos de absorção em 400 e 640 nm correspondentes, respectivamente, às formas catiônica e neutra do corante<sup>30</sup>. Após a formação do complexo corante-proteína, as bandas em 400 e 640 nm desaparecem enquanto há um aumento substancial da absorvância na região de 595 nm. Isto ocorre porque, devido à interação entre o corante e as proteínas do plasma, há um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm<sup>30</sup>.



**Figura 2.** Espectros de absorção do corante azul brilhante (1) e do complexo corante-proteína após a eluição do plasma humano na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA. Volume de plasma injetado: (2) 50, (3) 100 e (4) 200 µL. Fase móvel: água e vazão: 1,0 mL/min

Para as quatro colunas RAM-BSA, nas condições cromatográficas avaliadas, a exclusão das proteínas foi superior a 90% de eficiência, independente do volume de plasma injetado (50, 100 ou 200 µL) (Figura 3).



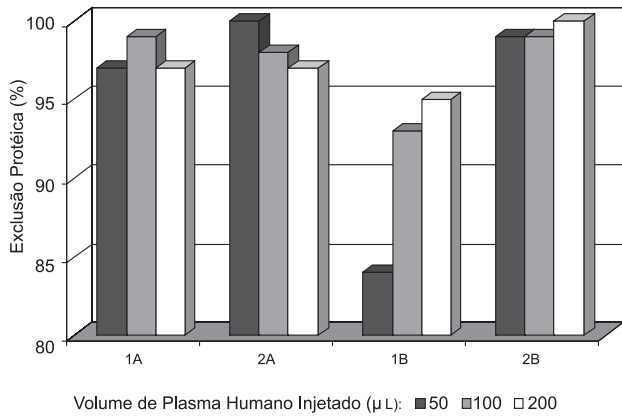
**Figura 3.** Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 5 min pelas colunas RAM-BSA (10 x 0,46 cm D.I.). Fase móvel: água e vazão: 1,0 mL/min

Com o intuito de avaliar se a diminuição do tamanho da coluna acarretaria em uma redução no tempo necessário para exclusão das proteínas, alíquotas de 50, 100 e 200 µL de plasma humano foram injetadas nas colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA de 4 x 0,46 cm D.I e de 10 x 0,46 cm D.I e os eluatos foram coletados durante 2 e 5 min, respectivamente. Os resultados, apresentados na Figura 4, mostram que independentemente do volume de plasma injetado, diminuindo-se o tamanho da coluna o tempo necessário para exclusão das proteínas também é reduzido.

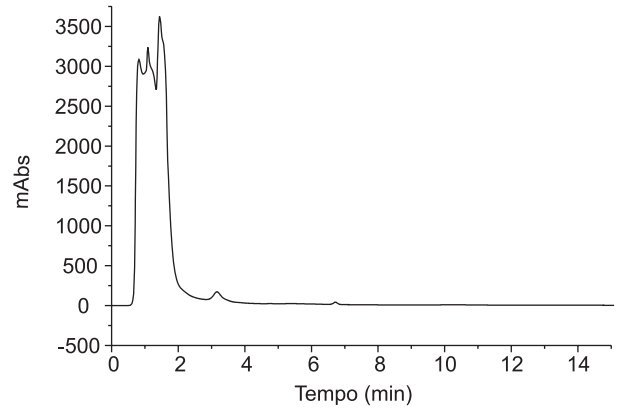
Os resultados evidenciam que, nas condições cromatográficas utilizadas, a BSA é suficientemente hidrofílica e, através de interações repulsivas, exclui com eficiência as proteínas do plasma. A Figura 5 mostra um típico cromatograma de exclusão das proteínas do plasma humano por uma coluna RAM-BSA.

#### Avaliação das colunas RAM na retenção de micromoléculas

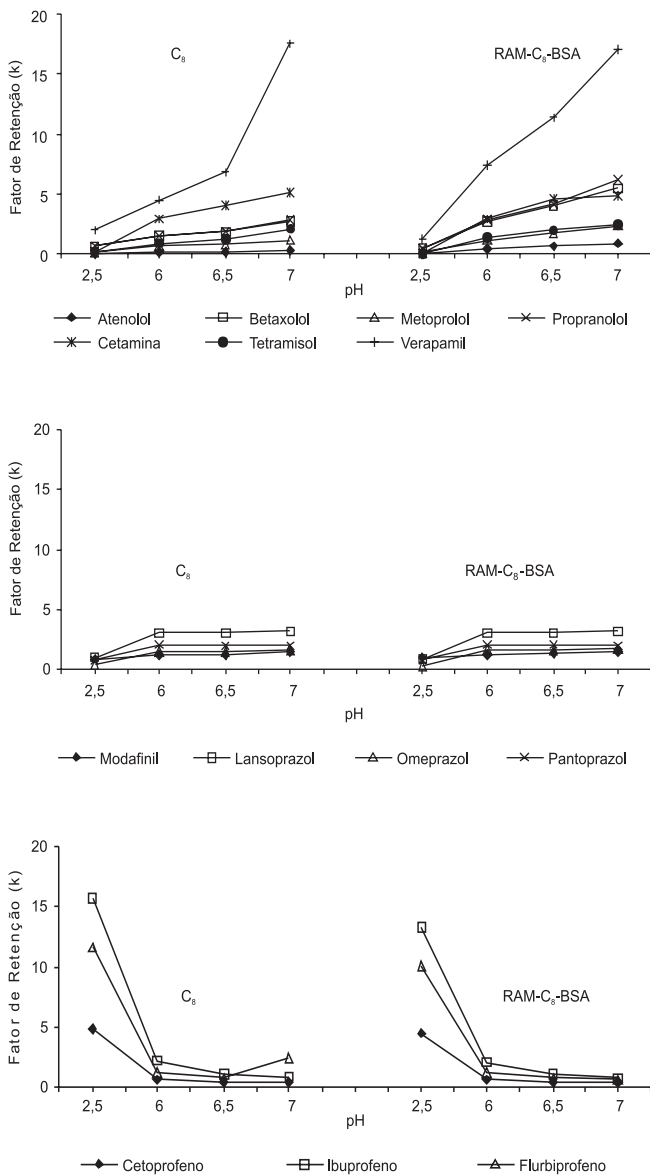
No modo reverso de eluição, quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será o valor do fator de retenção ( $k$ ). Quando um composto ácido ou básico ioniza, ele se torna muito mais hidrofílico e, conseqüentemente, o valor de  $k$  é reduzido. Assim, para um composto ácido quanto maior o pH da fase mó-



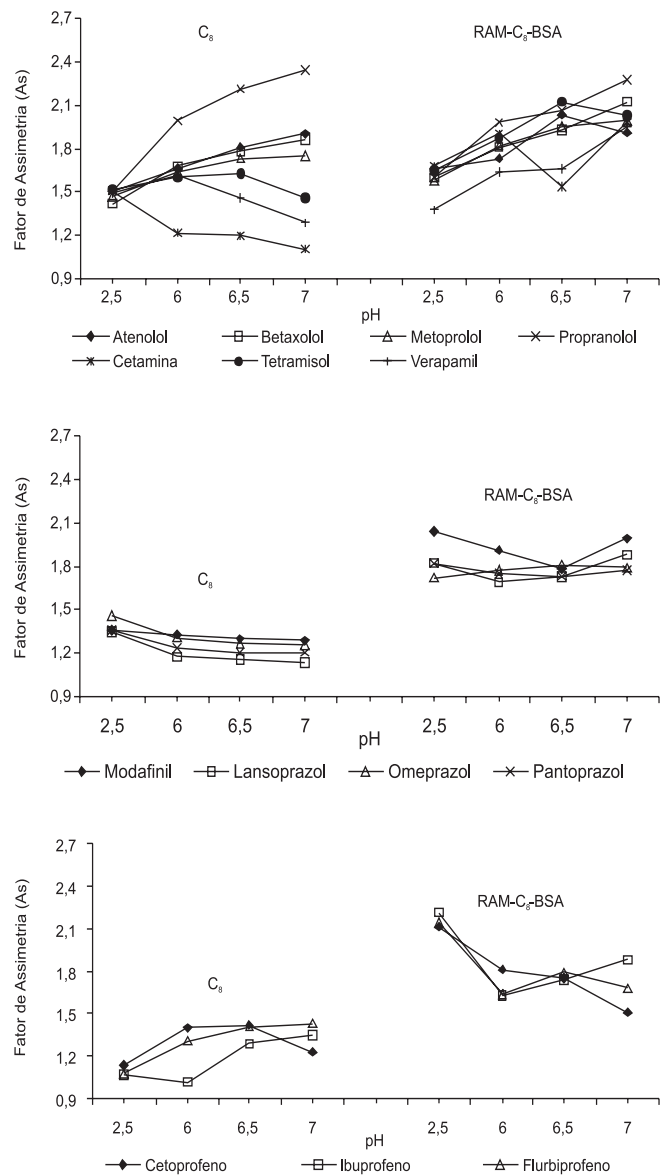
**Figura 4.** Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 5 min (A) e 2 min (B) pelas colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (10 x 0,46 cm D.I.) (1) e RAM-C<sub>8</sub>-BSA (4 x 0,46 cm D.I.) (2). Fase móvel: água e vazão: 1,0 mL/min



**Figura 5.** Cromatograma do plasma humano na coluna RAM-Ph-BSA (10 x 0,46 cm D.I.). Condições cromatográficas: Fase móvel: água, Vazão: 1,0 mL/min, volume de injeção: 200 μL e λ: 280 nm



**Figura 6.** Retenção dos fármacos básicos, neutros e ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (10 x 0,46 cm D.I.) e C<sub>8</sub> (10 x 0,46 cm D.I.)



**Figura 7.** Fator de assimetria (As) dos fármacos básicos, neutros e ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (10 x 0,46 cm D.I.) e C<sub>8</sub> (10 x 0,46 cm D.I.)

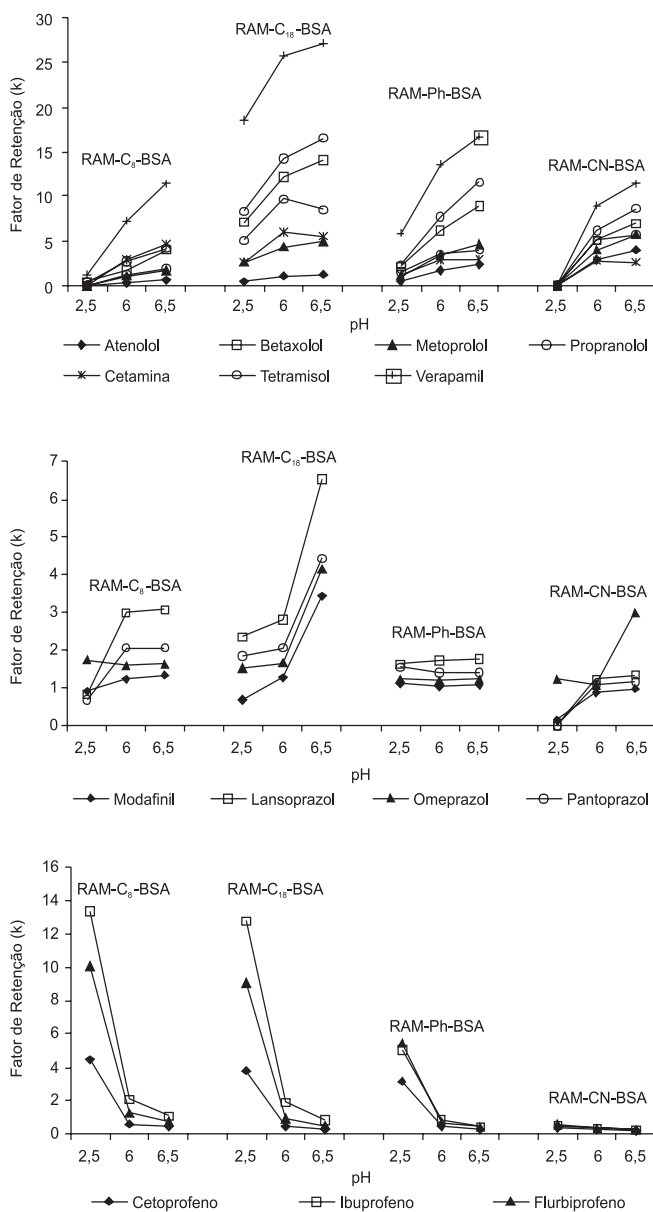
**Tabela 1.** Fármacos avaliados nas fases RAM-BSA

Compostos	Estrutura química	$\lambda$ (nm)	Categoria terapêutica
<b>Básicos</b>			
Atenolol		275	Anti-hipertensivo
Betaxolol			Anti-hipertensivo
Metoprolol			Anti-hipertensivo
Propranolol		290	Anti-hipertensivo
Cetamina		261	Anestésico intravenoso
Tetramisol		254	Anti-helmíntico de uso veterinário
Verapamil		275	Bloqueador de canais de cálcio
<b>Neutros</b>			
Modafinil		245	Antinarcoléptico
Lansoprazol		285	Supressor da secreção de HCl gástrico
Pantoprazol			Supressor da secreção de HCl gástrico
Omeprazol		302	Supressor da secreção de HCl gástrico
<b>Ácidos</b>			
Cetoprofeno		265	Antiinflamatório não esteroide
Ibuprofeno		228	Antiinflamatório não esteroide
Flurbiprofeno		254	Antiinflamatório não esteroide

vel menor é a sua retenção e, para um composto básico, a retenção aumenta. Para compostos neutros não ocorre variação de  $k$  em função do pH da fase móvel<sup>21</sup>.

Para avaliar o poder de retenção das colunas RAM-BSA preparadas, foram determinados, de modo sistemático, o fator de retenção ( $k$ ) e o fator de assimetria de bandas cromatográficas ( $As$ ) de uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros (Tabela 1) em condições adequadas de pH e concentração de modificador orgânico. Este estudo é importante para direcionar a escolha da coluna RAM-BSA para um determinado composto.

Os fatores de retenção e assimetria das bandas cromatográficas foram avaliados na coluna RAM- $C_8$ -BSA (10 x 0,46 cm D.I.) e em uma coluna  $C_8$  (10 x 0,46 cm D.I.) preparada com a mesma sílica usada na coluna RAM, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na parte experimental. O uso de fases móveis em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da albumina leva a uma perda de performance de exclusão e à precipitação das proteínas do plasma. Portanto, não é recomendável o uso de eluentes com pH entre 3 e 5



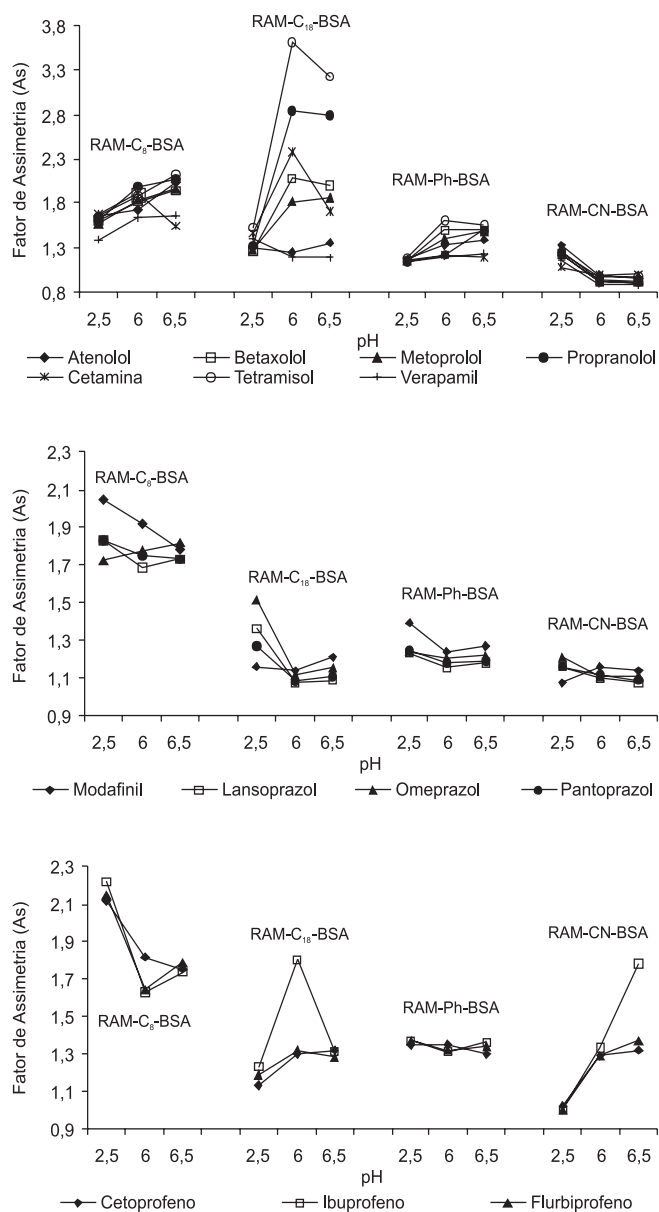
**Figura 8.** Retenção dos fármacos básicos, neutros e ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-BSA (10 x 0,46 cm D.I.)

em métodos analíticos por injeção direta de amostra que utilizam colunas RAM<sup>31</sup>. A Figura 6 mostra as variações do fator de retenção dos fármacos avaliados em função do pH da fase móvel.

Os resultados mostram que as retenções dos fármacos nas colunas RAM- $C_8$ -BSA e  $C_8$  são semelhantes, indicando que a BSA imobilizada não modificou a performance de retenção das fases hidrofóbicas. Porém, ocorreram mudanças significativas na assimetria das bandas cromatográficas (Figura 7) provavelmente devido à retenção secundária dos compostos, através de troca-iônica fraca.

Os fatores de retenção e as assimetrias das bandas cromatográficas dos mesmos compostos também foram determinados para as colunas RAM- $C_{18}$ -BSA, RAM-Ph-BSA e RAM-CN-BSA, nas mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente. As Figuras 8 e 9 mostram os resultados obtidos nessas três colunas e também, para efeito de comparação, na coluna RAM- $C_8$ -BSA.

Como pode ser observado, na Figura 8, a coluna RAM- $C_{18}$ -BSA apresentou um comportamento mais retentivo para os compos-



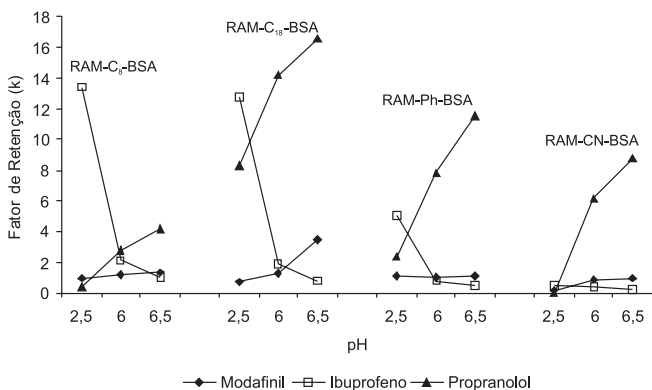
**Figura 9.** Fator de assimetria ( $As$ ) dos fármacos básicos, neutros e ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-BSA (10 x 0,46 cm D.I.)



tos básicos e neutros em relação às demais colunas. Para os compostos ácidos, esta coluna apresentou um perfil de retenção semelhante ao da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA porém, a mesma mostrou-se mais retentiva do que as colunas RAM-Ph-BSA e RAM-CN-BSA.

O uso de colunas RAM para injeção direta de amostra na maioria das vezes está associado à cromatografia multidimensional, uma vez que estas colunas quase sempre apresentam baixa eficiência analítica. Desta forma, bandas cromatográficas com alta assimetria podem ser aceitas, uma vez que as mesmas vão ser transferidas para uma coluna analítica eficiente. As colunas avaliadas mostraram assimetria de bandas apropriadas para serem utilizadas em cromatografia multidimensional. Entretanto, para os compostos Tetramisol e Propranolol, em pH 6,0, a coluna RAM-C<sub>18</sub>-BSA mostrou assimetria superior a 2,3, o que pode dificultar a eficiente transferência da banda cromatográfica (Figura 9).

A Figura 10 mostra os fatores de retenção do Propranolol (básico), Modafinil (neutro) e Ibuprofeno (ácido) nas quatro colunas RAM-BSA. Os resultados obtidos evidenciam que a retenção destes compostos ocorre segundo mecanismos de eluição no modo reverso, com pouca ou nenhuma influência de mecanismos de troca-iônica.



**Figura 10.** Retenção dos fármacos Modafinil (neutro), Ibuprofeno (ácido) e Propranolol (básico) em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-BSA (10 x 0,46 cm D.I.)

## CONCLUSÃO

A desproteínação do plasma humano, por injeção direta de amostras, foi conseguida de modo eficiente nas quatro colunas RAM-BSA utilizando-se água como fase móvel. Estas colunas apresentaram fatores de retenção adequados para os compostos avaliados, o que permite a exclusão das proteínas sem perdas dos analitos. Para os compostos ácidos e básicos, a variação do pH da fase móvel permite a adequação dos fatores de retenção.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq pelas bolsas de estudo e suporte financeiro. À Profa. Dra. S. A. Calafatti da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, SP, pela doação do plasma humano.

## REFERÊNCIAS

- Kataoka, H.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 232.
- Smith, R. M.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 3.
- Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2004**, *801*, 141.
- Hennion, M. C.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 3.
- Rossi, D. T.; Zhang, N.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 97.
- Yoshida, H.; Morita, I.; Tamai, G.; Masujima, T.; Tsuru, T.; Takai, N.; Imai, H.; *Chromatographia* **1984**, *19*, 466.
- Hagestam, H.; Pinkerton, T. C.; *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1757.
- Desilets, C. P.; Rounds, M. A.; Regnier, F. E.; *J. Chromatogr.* **1991**, *544*, 25.
- Haginaka, J.; *Trends Anal. Chem.* **1991**, *10*, 17.
- Boos, K. S.; Rudolph, A.; *LC-GC* **1997**, *15*, 602.
- Boos, K. S.; Grimm, C. H.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 175.
- Gisch, D. J.; Hunter, B. T.; Feibush, B.; *J. Chromatogr.* **1988**, *433*, 264.
- Boos, K. S.; Rudolph, A.; Vielhauer, S.; Walford, A.; Lubda, D.; Eisenbeiss, F.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *352*, 684.
- Cortes, H. J.; *Multidimensional Chromatography: Techniques and Applications*, Marcel Dekker: New York, 1990.
- Majors, R. E.; Boos, K. S.; Grimm, C. H.; Lubda, D.; Wieland, G.; *LC-GC* **1996**, *14*, 554.
- Rudolph, A.; Boos, K. S.; *LC-GC* **1997**, *15*, 814.
- Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Cassiano, N. M.; Pedrazzoli Júnior, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *766*, 153.
- Menezes, M. L.; Felix, G.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, *19*, 3221.
- Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- Cassiano, N. M.; Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Wainer, I. W.; *Chirality* **2002**, *14*, 731.
- Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley: New York, 1997.
- Oda, Y.; Asakawa, N.; Abe, S.; Yoshida, Y.; Sato, T.; *J. Chromatogr.* **1991**, *572*, 133.
- Hermansson, J.; Grahn, A.; *J. Chromatogr.* **1994**, *660*, 119.
- Oliveira, R. V.; Cass, Q. B.; *Resumos do 12º Encontro Nacional de Química Analítica*, São Luís, Brasil, 2003.
- Cass, Q. B.; Gomes, R. F.; Calafatti, S. A.; Pedrazzoli Júnior, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 235.
- Cass, Q. B.; Lima, V. V.; Oliveira, R. V.; Cassiano, N. M.; Degani, A. L. G.; Pedrazzoli Júnior, J.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *798*, 275.
- Gomes, R. F.; Cass, Q. B.; Calafatti, S. A.; Pedrazzoli Júnior, J.; *Resumos da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2003.
- Yasar, Ü.; Tybring, G.; Hidestrand, M.; Oscarson, M.; Ingelman-Sundberg, M.; Dahl, M. L.; Eliasson, E.; *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 1051.
- Friedrich, G.; Rose, T.; Rissler, K.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *784*, 49.
- Compton, S. J.; Jones, C. G.; *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369.
- Yu, Z.; Westerlund, D.; *Chromatographia* **1997**, *44*, 589.