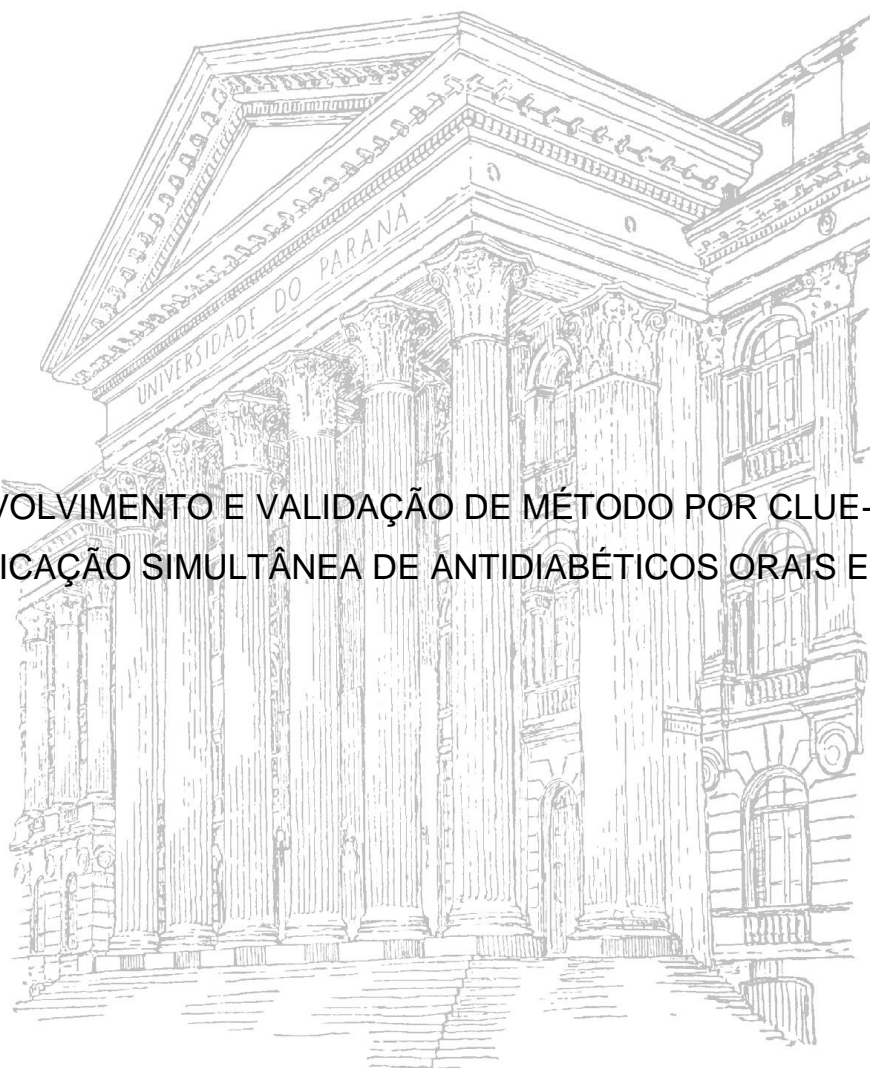


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MILLAN FACHI

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLUE-EM PARA
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA



CURITIBA

2016

MARIANA MILLAN FACHI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLUE-EM PARA
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2016

Fachi, Mariana Millan

Desenvolvimento e validação de método por CLUE-EM para quantificação simultânea de antidiabéticos orais em plasma / Mariana Millan Fachi – Curitiba, 2016.
163 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Antidiabéticos. 2. Diabetes. 3. Monitoramento. 4. CLUE-EM. 5. Validação. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

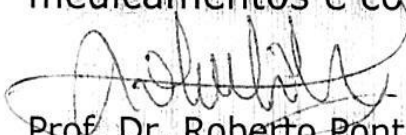
CDD 616.462


TERMO DE APROVAÇÃO

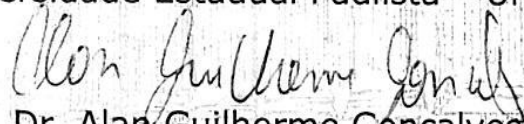
MARIANA MILLAN FACHI

**Título: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
POR CLUE-EM PARA QUANTIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA DE ANTIDIABÉTICOS EM PLASMA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador


Prof. Dr. Michel Leandro de Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP


Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 31 de março de 2016.

A minha família por todo amor e carinho.

Ao Rafael que esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram durante este período de mestrado.

A Deus por tudo que me proporcionou na vida, servindo como meu principal amparo.

Aos meus pais Maria Francisca Millan e Devanir Fachi, que sempre me guiaram nas minhas escolhas e atitudes da vida, sendo meus maiores exemplos de vida e valores. Por confiarem nas minhas decisões, respeitarem-as e por nunca deixar que as dificuldades destruíssem nossos sonhos.

A minha irmã Fernanda Millan Fachi, que sempre foi meu maior apoio. Agradeço pela imensa paciência, dedicação, companhia, por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.

Ao Rafael Sanfelice que esteve ao meu lado durante esta trajetória, por toda paciência, compreensão, amor, incentivo e companheirismo.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo longe sempre estiveram comigo. Agradeço pelas conversas e pelo apoio. Sem dúvida grande parte do que eu sou me inspirei e dedico a vocês.

Aos amigos que fiz durante este período, incluindo as meninas do GEATS, as maravilhandas, os “broders” e o pessoal do CEB. Agradeço por terem me recebido tão bem, pela disposição, pela amizade, paciência e principalmente pelos ensinamentos compartilhados. Com certeza aprendi muito durante esses dois anos de convivência.

Em especial à Letícia Bonâncio e Letícia Leonart, por trabalharem ao meu lado na realização deste projeto, pelas histórias, pela paciência, pelo empenho de compartilhar suas experiências e ensinamentos e principalmente pela amizade. Vocês foram simplesmente incríveis e espero conseguir retribuir um pouco o que fizeram por mim.

Por fim ao meu admirável orientador Roberto Pontarolo, por me dar esta oportunidade de aprender tanto. Agradeço imensamente pelo exemplo, pela confiança, incentivo, paciência e por estar sempre disposto a nos auxiliar.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.

Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser.

Mas, graças a Deus, não somos o que éramos”.

(Martin Luther King)

RESUMO

O monitoramento dos níveis plasmáticos dos antidiabéticos pode ser usado para avaliar a adesão terapêutica e para o ajuste de dose de acordo com as necessidades de cada paciente. Diante disso, vários métodos bioanalíticos tem sido desenvolvidos e validados com o objetivo de quantificar e monitorar estes fármacos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo conduzir uma revisão sistemática sobre métodos bioanalíticos desenvolvidos para quantificar associações de antidiabéticos em sangue humano, assim como desenvolver e validar um novo método bioanalítico para a quantificação simultânea de representantes das principais classes de antidiabéticos orais disponíveis comercialmente. Para realizar a revisão sistemática, foram buscados em bases eletrônicas artigos com os descritores “validação bioanalítica”, “antidiabéticos” e “sangue humano” e variações nas bases de dados Pubmed, Web of Science e Scopus, além de busca manual. Foram encontradas 2945 publicações, das quais somente 34 contemplaram os critérios de inclusão. Ao extrair os dados destes estudos, observou-se que a maioria dos métodos analisou somente dois antidiabéticos. Com relação à preparação da amostra e à técnica analítica, destacaram-se a precipitação de proteínas e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, respectivamente. Além disso, ao se comparar as validações dos métodos com os principais guias bioanalíticos, foi possível constatar vários problemas na execução dos parâmetros requeridos, o que pode comprometer a confiabilidade dos resultados do monitoramento terapêutico. Esses resultados demonstraram a falta de padronização na execução dos procedimentos de validação. Com base nas lacunas evidenciadas pela revisão, um novo método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolo tempo de voo (CLUE-QTOF-EM) para determinação simultânea de clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, nateglinida, pioglitazona, rosiglitazona e vildagliptina em plasma humano foi desenvolvido. Após a preparação da amostra por precipitação de proteínas com acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico, foi efetuada a separação dos analitos utilizando como fase estacionária uma coluna ciano (100 x 2,1 mm, 1,8 µm, Waters), e como fase móvel acetonitrila/água (ambas com 0,1% de ácido fórmico) em modo gradiente. Os analitos foram detectados no modo positivo de ionização utilizando como fonte a *electrospray*. Sulfaquinoxalina e isoniazida foram utilizadas como padrões internos. O método foi validado de acordo com os principais guias bioanalíticos, e apresentou seletividade, linearidade, precisão, exatidão e foi isento de efeitos residuais e de matriz. Além disso, os analitos apresentaram recuperação reprodutível e foram estáveis nas condições testadas. O método desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação simultânea dos principais representantes das cinco classes de antidiabéticos orais mais recomendadas, possibilitando o monitoramento terapêutico de pacientes diabéticos com diferentes terapias farmacológicas através de um único método bioanalítico.

Palavras-chave: antidiabéticos, diabetes, monitoramento, CLUE-EM, validação.

ABSTRACT

The monitoring of antidiabetic drugs concentration in the bloodstream can be used to evaluate patients' adherence and for dose adjustments, according to the needs of each patient. Considering this, several bioanalytical methods have been developed and validated with the intention of quantifying and monitoring drug associations. Therefore the present study aimed to systematically review the available bioanalytical methods that quantify combination of antidiabetic drugs in human blood. We also intended to develop and to validate a new bioanalytical method for the simultaneous quantification of the main antidiabetic oral agents commercially available. For the systematic review the descriptors "bioanalytical validation", "antidiabetic drugs", "human blood" and its variations were employed for electronic searches in Pubmed, Web of Science and Scopus databases, besides manual search. A total of 2945 records were identified and only 34 records contemplated the inclusion criteria. During data extraction, it was observed that the majority of the methods were developed for only two drugs. Concerning sample preparations and analytical technique, protein precipitation and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, respectively, stood out. Moreover, when compared the validation process with the main bioanalytical guidelines, it was possible to verify several problems in the execution of the required parameters and these problems may compromise the credibility of the results for the therapeutic monitoring. These results demonstrated the lack of standardization in the execution of validation procedures. Based on the gaps highlighted on our review a new method based on ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) for simultaneous determination of chlorpropamide, glibenclamide, gliclazide, glimepiride, metformin, nateglinide, pioglitazone, rosiglitazone and vildagliptin in human plasma was developed. After the sample preparation by protein precipitation in acetonitrile containing 1% formic acid, the separation of the analytes was performed using as stationary phase a column cyano (100 x 2,1 mm, 1,8 μ m, Waters) and as mobile phase acetonitrile/water (both containing 1% of formic acid) under gradient elution. The analytes were detected with positive ionization mode, using electrospray ionization as source. Sulfaquinoxaline and isoniazide were used as internal standards. The method was validated according to the bioanalytical main guidelines, and showed selectivity, linearity, precision, accuracy and was free of residual effects and matrix. The analytes presented reproducible recovery and were stable under the tested conditions. The developed and validated method showed to be adequate for the simultaneous quantification of the main agents of the five more recommended antidiabetic oral classes, which can enable the therapeutic monitoring in diabetic patients with different pharmacological therapies through a single bioanalytical method.

Keywords: antidiabetic drugs, diabetes, therapeutic monitoring, UPLC-QTOF-MS, validation.

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.....	95
EQUAÇÃO 2.....	95
EQUAÇÃO 3.....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA METFORMINA OU N,N-DIMETILBIGUANIDA.	36
FIGURA 2 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA CLORPROPAMIDA (A), GLIBENCLAMIDA (B), GLICLAZIDA (C) E GLIMEPIRIDA (D).....	38
FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE NATEGLINIDA	39
FIGURA 4 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA VILDAGLIPTINA	39
FIGURA 5 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA PIOGLITAZONA (A) E ROSIGLITAZONA (B).....	40
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE ARTIGOS (FLOWCHART).....	59
FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE ISONIAZIDA.....	85
FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE SULFAQUINOXALINA.....	86
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA OBTIDO DA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 150 NG.ML ⁻¹ DOS SEGUINTE ANALITOS: CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA.....	103
FIGURA 10 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DOS ANALITOS CLORPROPAMIDA (A), GLIBENCLAMIDA (B), GLICLAZIDA (C), GLIMEPIRIDA (D), METFORMINA (E), NATEGLINIDA (F), PIOGLITAZONA (G), ROSIGLITAZONA (H) E VILDAGLIPTINA (I) A 150 NG.ML ⁻¹ E DOS PADRÕES INTERNOS ISONIAZIDA (200 NG.ML ⁻¹) (J) E SULFAQUINOXALINA (75 NG.ML ⁻¹) (K) (EM PLASMA A PARTIR DOS SEUS RESPECTIVOS TEMPO DE RETENÇÃO.	104
FIGURA 11 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM A CLORPROPAMIDA (B), GLIBENCLAMIDA (C), GLICLAZIDA (D), GLIMEPIRIDA (E), METFORMINA (F), NATEGLINIDA (G), PIOGLITAZONA (H), ROSIGLITAZONA (I) E VILDAGLIPTINA (J).	107

FIGURA 12 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM A ISONIAZIDA (B) E SULFAQUINOXALINA (C).	108
FIGURA 13 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLORPROPAMIDA NO INTERVALO DE 50 A 450 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA	109
FIGURA 14 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIBENCLAMIDA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA	110
FIGURA 15 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLICLAZIDA NO INTERVALO DE 5 A 100 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA.....	111
FIGURA 16 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIMEPIRIDA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA	112
FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE METFORMINA NO INTERVALO DE 25 A 400 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA	113
FIGURA 18 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE NATEGLINIDA NO INTERVALO DE 50 A 400 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA	114
FIGURA 19 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PIOGLITAZONA NO INTERVALO DE 25 A 200 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA.....	115
FIGURA 20 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ROSIGLITAZONA NO INTERVALO DE 12,5 A 100 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA.....	116
FIGURA 21 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE VILDAGLIPTINA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML ⁻¹ EM PLASMA.....	117
FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE ISONIAZIDA (A) E SULFAQUINOXALINA (B) SENDO (i) AMOSTRA PROCESSADA COM A CONCENTRAÇÃO DO LIQ E (ii) AMOSTRA BRANCO INJETADA APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA PROCESSADA DO LSQ	123
FIGURA 23 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE CLORPROPAMIDA(A), GLIBENCLAMIDA(B), GLICLAZIDA(C), GLIMEPIRIDA(D), METFORMINA(E), NATEGLINIDA(F), PIOGLITAZONA(G), ROSIGLITAZONA(H) E VILDAGLIPTINA(I) SENDO (i) AMOSTRA PROCESSADA COM A CONCENTRAÇÃO DO LIQ E (ii) AMOSTRA BRANCO INJETADA APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA PROCESSADA DO LSQ.....	124

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – NÚMERO DE ESTUDOS QUE QUANTIFICARAM CADA UM DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS ENTRE OS MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	61
GRÁFICO 2 – PADRÕES INTERNOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS INCLUÍDOS DA REVISÃO	65
GRÁFICO 3 – TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E AGENTES PRECIPITANTES UTILIZADOS	69
GRÁFICO 4 – RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES.	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS BASAIS DOS MÉTODOS VALIDADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM SANGUE HUMANO ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	62
TABELA 2 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E RECUPERAÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS.....	74
TABELA 3 – RELAÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	85
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	92
TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	94
TABELA 6 – ÍONS MOLECULARES DE CADA COMPOSTO.....	102
TABELA 7 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM ESTUDO EM PLASMA.....	106
TABELA 8 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLORPROPAMIDA.....	109
TABELA 9 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIBENCLAMIDA.....	110
TABELA 10 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLICLAZIDA.....	111
TABELA 11 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIMEPIRIDA.....	112
TABELA 12 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METFORMINA.....	113

TABELA 13 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA NATEGLINIDA	114
TABELA 14 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PIOGLITAZONA.....	115
TABELA 15 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ROSIGLITAZONA	116
TABELA 16 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VILDAGLIPTINA	117
TABELA 17 – RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLUE-EM EM AMOSTRAS DE PLASMA	118
TABELA 18 – RECUPERAÇÃO OBTIDA COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA CONTENDO 1% DE ÁCIDO FÓRMICO	121
TABELA 19 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ	122
TABELA 20 – ESTABILIDADE DA CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA EM SOLUÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	126
TABELA 21 – ESTABILIDADE DA CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA EM PLASMA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	127
TABELA 22 – DADOS BASAIS DO MÉTODO VALIDADO DO ESTUDO.....	162
TABELA 23 – DADOS OBTIDOS DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS....	162
TABELA 24 – DADOS OBTIDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	162
TABELA 25 – DADOS OBTIDOS DE MÉTODOS DESENVOLVIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR	163

TABELA 26 – DADOS VINCULADOS AOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO	163
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACE/ACE	– <i>American Association of Clinical Endocrinologists / American College of Endocrinology</i>
ADA	– <i>American Diabetes Association</i>
AMP _c	– Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização química a pressão atmosférica
ATP	– Adenosina trifosfato
BPN	– Amostra branco plasma normal
BPZ	– Amostra branco plasma zero
CAD	– Cetoacidose diabética
CE	– Eletroforese capilar
CL	– Cromatografia líquida
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CLOR	– Clorpropamida
CLUE	– Cromatografia líquida de ultra eficiência
CQ	– Controle de qualidade
CQA	– Controle de qualidade de alta concentração
CQB	– Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	– Controle de qualidade de média concentração
CQD	– Controle de qualidade de diluição
CV	– Coeficiente de variação
DAD	– Arranjo de diodos
DM	– <i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	– <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	– <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DPP-4	– Dipeptidil peptidase 4
DPR	– Desvio padrão relativo
EASD	– <i>European Association for the Study of Diabetes</i>
EFS	– Extração em fase sólida
EHH	– Estado hiperosmolar hiperglicêmico
EM	– Espectrometria de massas
EMA	– <i>European Medicines Agency</i>

EM/EM	– Espectrometria de massas sequencial
EPR	– Erro padrão relativo
ESI	– Ionização por <i>Electrospray</i>
FA	– Amostras fortificadas antes do processo de extração
FD	– Amostras fortificadas depois do processo de extração
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FMN	– Fator de matriz normalizado
GBC	– Glibenclamida
GCZ	– Gliclazida
GLP-1	– Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GMP	– Glimepirida
HbA _{1c}	– Hemoglobina glicada
HILIC	– Cromatografia líquida com interação hidrofílica
HDL	– Lipoproteína de alta densidade
ICH	– <i>International Conference on Harmonisation</i>
IDF	– <i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	– Interleucina-6
IRS	– Substrato do receptor de Insulina
ISO	– Isoniazida
k	– Fator de retenção
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
LD	– Limite de detecção
LIQ	– Limite inferior de quantificação
LL	– Extração líquido-líquido
MCP	– <i>Microchannel plate detector</i>
MET	– Metformina
MODY	– <i>Maturity onset diabetes of the young</i>
m/z	– Relação massa/carga
NAT	– Nateglinida
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PI	– Padrão interno
PIO	– Pioglitazona
PP	– Extração por precipitação de proteínas
PPAR	– Receptores ativados por proliferador de peroxissomo

QqQ	– Triplo quadrupolo
QTOF	– Quadrupolo-tempo de voo
r	– Coeficiente de correlação linear
ROSI	– Rosiglitazona
RPM	– Rotações por minuto
SFC	– Cromatografia em fluido supercrítico
S/R	– Relação sinal-ruído
SBD	– Sociedade Brasileira de Diabetes
SQR	– Substância química de referência
SGLT-2	– Transportador de sódio e glicose 2
SULF	– Sulfaquinoxalina
TG	– Triglicerídeos
TNF- α	– Fator de necrose tumoral α
USP	– <i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	– Ultravioleta
v/v	– Volume/volume
VDP	– Vildagliptina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. OBJETIVO GERAL	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. DIABETES	25
2.1.1. Classificação.....	26
2.1.2. Fisiopatologia.....	27
2.1.3. Epidemiologia	30
2.2. TRATAMENTO	31
2.2.1. Anti-hiperglicemiantes.....	31
2.2.2. Hipoglicemiantes.....	33
2.2.3. Agentes que aumentam a secreção de insulina dependente de glicose e que diminuem a secreção de glucagon	34
2.2.4. Agentes que promovem a glicosúria.....	35
2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS	36
2.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	41
2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS	42
2.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43
2.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	46
2.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação.....	46
2.7.2. Seletividade	47
2.7.3. Curva de Calibração	47
2.7.4. Controles de qualidade (CQ)	47
2.7.5. Precisão e Exatidão	48
2.7.6. Recuperação	49
2.7.7. Efeito matriz.....	49
2.7.8. Efeito residual	49
2.7.9. Estabilidade	50

2.8. REVISÃO SISTEMÁTICA	50
CAPÍTULO 1 - REVISÃO SISTEMÁTICA	52
3. INTRODUÇÃO	53
3.1. OBJETIVO GERAL	55
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA	56
4.1.1. Critérios de inclusão	56
4.1.2. Critérios de exclusão	57
4.1.3. Localização dos estudos.....	57
4.1.4. Seleção dos estudos.....	58
4.1.5. Extração dos dados	58
4.1.6. Síntese dos resultados	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. ESTUDOS INCLUÍDOS	59
5.2. ESTUDOS EXCLUÍDOS	60
5.3. ANTIDIABÉTICOS ANALISADOS NOS ESTUDOS	60
5.4. PADRÕES INTERNOS	64
5.5. MÉTODOS BIONALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA HUMANO ..	65
5.6. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE	68
5.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICOS	69
5.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação.....	70
5.7.2. Seletividade	70
5.7.3. Curva de Calibração	71
5.7.4. Precisão	72
5.7.5. Exatidão	73
5.7.6. Recuperação	73
5.7.7. Efeito Matriz.....	76

5.7.8. Efeito Residual.....	78
5.7.9. Estabilidade	79
5.7.10. Robustez.....	79
5.7.11. <i>System suitability</i>	80
6. CONCLUSÃO.....	81
CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	82
7. INTRODUÇÃO	83
7.1. OBJETIVO GERAL	84
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	84
8. MATERIAL E MÉTODOS	85
8.1. PADRÕES ANALÍTICOS	85
8.2. SOLVENTES E REAGENTES	86
8.3. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO	86
8.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLUE-EM	87
8.4.1. Preparo das soluções estoque	87
8.4.2. Preparação das soluções de trabalho.....	87
8.4.3. Otimização dos parâmetros espectrométricos	87
8.4.4. Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	88
8.5. TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO.....	89
8.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	89
8.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	90
8.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação.....	90
8.7.2. Seletividade	91
8.7.3. Curva de calibração	92
8.7.4. Amostras de controle de qualidade.....	93
8.7.5. Precisão e Exatidão	94
8.7.6. Recuperação	95

8.7.7. Efeito Matriz	95
8.7.8. Efeito Residual.....	96
8.7.9. Estabilidade	97
8.8. APLICAÇÃO DO MÉTODO	98
8.8.1. Preparação das amostras para aplicação do método.....	99
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
9.1. SELEÇÃO DOS PADRÕES INTERNOS	100
9.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS	100
9.3. TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO.....	105
9.4. VALIDAÇÃO.....	106
9.4.1. Limites de detecção e limite inferior quantificação	106
9.4.2. Seletividade	106
9.4.3. Curva de calibração	108
9.4.4. Precisão e Exatidão	118
9.4.5. Recuperação	120
9.4.6. Efeito Matriz	122
9.4.7. Efeito residual	123
9.4.8. Estabilidade	125
9.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO	128
10. CONCLUSÃO.....	130
11. REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICES.....	152

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) consiste em um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação e/ou secreção da insulina (BRUNTON et al., 2012). A classificação atual do diabetes baseia-se na sua etiologia, sendo as principais formas o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional. Destaca-se dentre essas o DM2 por corresponder a 90% dos casos de diabetes. O DM2 está vinculado a sobrepeso ou obesidade, podendo ocorrer em qualquer idade (SBD, 2015).

Atualmente existem aproximadamente 415 milhões de pessoas com diabetes no mundo. Estima-se ainda que até 2035, aproximadamente 642 milhões de pessoas serão diabéticas (IDF/SBD, 2014; IDF, 2015).

A hiperglicemia crônica, quando não tratada, pode desencadear complicações a longo prazo, como nefropatia, retinopatia, neuropatia periférica e comprometimentos vasculares, importantes fatores de morbidade e mortalidade (ADA, 2011).

Com base no alto número de acometidos por essa patologia e as suas consequências, torna-se imprescindível um tratamento adequado associando o tratamento não farmacológico, como dieta equilibrada e exercícios físicos, ao tratamento farmacológico (WHO/FAO, 2003; SBD, 2014, 2015).

Em relação ao tratamento farmacológico do DM, o arsenal terapêutico tem aumentado significativamente nos últimos anos, havendo sete classes de fármacos orais comercialmente disponíveis. Diante da variedade de agentes terapêuticos disponíveis e visando a orientar os prescritores na definição da conduta terapêutica, os algoritmos disponíveis sobre o tema recomendam como primeira escolha no tratamento a monoterapia. Porém, como esta é ineficaz para a maioria dos diabéticos, é comum na prática clínica a utilização de associações de antidiabéticos (INZUCCHI et al., 2012; AACE/ACE, 2015; SBD, 2015; ADA, 2015).

Além disso, a adesão do paciente ao tratamento, o que garante uma concentração adequada do fármaco na circulação sanguínea, é imprescindível para o sucesso da terapia. Para avaliar tal fator, a prática do monitoramento terapêutico é recomendada. Este monitoramento permite tanto avaliar a adesão quanto realizar ajustes de dose, considerando as necessidades de cada

paciente. Em vista disso, diferentes métodos bioanalíticos foram desenvolvidos e validados objetivando o doseamento destes fármacos em amostras biológicas (KANG; LEE, 2009).

Levando em consideração o apresentado, o presente trabalho foi realizado em duas etapas complementares, com os seguintes objetivos: realizar uma revisão sistemática envolvendo todos os métodos bioanalíticos validados para a quantificação de associações de antidiabéticos em sangue humano encontrados na literatura científica, e desenvolver e validar um método por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) para a quantificação de representantes das principais classes de antidiabéticos orais em plasma, de modo a aperfeiçoar o monitoramento terapêutico dessas substâncias em pacientes diabéticos.

1.1. OBJETIVO GERAL

Conduzir uma revisão sistemática de métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados para quantificar associações de antidiabéticos orais em sangue humano.

Desenvolver e validar um método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (EM) para a quantificação simultânea de representantes de diferentes classes de antidiabéticos orais em amostras de plasma humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DIABETES

O diabetes *mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado pelo aumento da concentração de glicose sanguínea, desencadeado pela insuficiência da produção e/ou ação da insulina (CORREIA et al., 2012).

A insulina é responsável por regular a concentração glicêmica, por induzir a captação e o metabolismo de glicose para os músculos e tecido adiposo, além de inibir a degradação de glicogênio, lipídeos e proteínas (BRUNTON et al., 2012).

O diagnóstico laboratorial do DM baseia-se em três critérios: a glicemia casual, a glicemia em jejum e a glicemia após duas horas de sobrecarga de 75 gramas de glicose, quando superior a 200 mg.dL⁻¹ para o primeiro caso, 126 mg.dL⁻¹ (ou 7 mmol.L⁻¹) para o segundo caso e 200 mg.dL⁻¹ (ou 11 mmol.L⁻¹) para o terceiro (WHO/IDF, 2006; BARRETT, 2013). A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) é considerada o padrão-ouro para o acompanhamento glicêmico de pacientes diabéticos e reflete a glicose plasmática média dos últimos 2-3 meses, sendo também considerada um critério de diagnóstico quando superior a 6,5% (ADA, 2015).

O DM está vinculado a alto risco de desenvolvimento de complicações agudas e crônicas. Entre as complicações agudas, destaca-se a cetoacidose diabética (CAD) e o estado hiperosmolar hiperglicêmico (EHH), diferenciados por apresentar cetonemia e acidose ânion-gap no caso de CAD e hiperosmolaridade e desidratação em EHH (PINHAS-HAMIEL; ZEITLER, 2007; MALETKOVIC; DREXLER, 2013).

A relação da cronicidade do DM com anomalias estruturais de órgãos específicos e o descontrole do nível glicêmico pode resultar em complicações crônicas, como retinopatia, com potencial perda de visão; nefropatia, com posterior falência renal; neuropatia periférica, com riscos de úlceras e amputações das porções periféricas; e comprometimentos vasculares, que aumentam a incidência de doenças coronárias, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (SINGH et al., 2013; LIN et al., 2014).

2.1.1. Classificação

O DM atualmente é classificado pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com sua etiologia, em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), gestacional e outros tipos específicos de DM (VACANTE et al., 2011; SBD, 2015; ADA, 2015).

O DM1 representa 5 a 10% dos casos de DM, e é definido como uma condição em que há destruição de células β -pancreáticas, com consequente deficiência na síntese de insulina. Geralmente é diagnosticada na infância ou adolescência, apresentando sintomas característicos como polidipsia, polifagia e poliúria (ATKINSON et al., 2014). O DM1 pode ser subdividido em duas formas: tipo 1A, associado à suscetibilidade genética, fatores ambientais e alterações epigenéticas e que acarretam o comprometimento imunológico com produção de marcadores autoimunes; e o tipo 1B, idiopático (CANIVELL; GOMIS, 2014).

O DM2 está vinculado à resistência à insulina ou ao comprometimento funcional das células β , constituindo um forte agravante na saúde global, uma vez que representa aproximadamente 90% dos pacientes diabéticos (ZHANG et al., 2014). Comumente é diagnosticado após os 30 anos, porém pode ocorrer em todas as idades. Está associado a fatores de risco como obesidade e sedentarismo (MOVVA et al., 2014).

O DM gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Acomete aproximadamente 15% de todas as gestantes no mundo, estando relacionado tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β (CHO, 2013).

Os demais tipos específicos de DM tem uma apresentação clínica bastante variável. Destaca-se o *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY), diagnosticado geralmente antes dos 25 anos em indivíduos não obesos. Neste tipo de diabetes há uma alteração gênica de herança autossômica dominante, responsável pelo defeito na secreção de insulina, mas sem causar a dependência da mesma (MARASCHIN et al., 2010).

2.1.2. Fisiopatologia

As ilhotas de Langerhans no pâncreas são compostas por quatro tipos de células, havendo as células β , responsáveis pela síntese da insulina, e as células α , produtoras do hormônio glucagon. Esses hormônios operam em equilíbrio dinâmico na manutenção do nível glicêmico (FULOP et al., 2003; BRUNTON et al., 2012).

Em relação à insulina, sua origem é a partir de seu precursor inativo, a pré-pró-insulina. Este precursor sofre reações de proteólise, produzindo inicialmente a pró-insulina e posteriormente acondicionado em grânulos secretores juntamente com enzimas responsáveis pela conversão no hormônio ativo (ASHCROFT; RORSMAN, 2012).

Na presença de glicose, as células β -pancreáticas agem como sensores primários, gerando um aumento de cálcio intracelular e a liberação de insulina. Ao ser liberado, esse hormônio desempenha ações sobre o tecido adiposo, muscular e hepático, estimulando o uso e armazenamento intracelular de glicose, aminoácidos e ácidos graxos e inibindo a degradação de glicogênio, lipídeos e proteínas (ANTUNA-PUENTE et al., 2011).

A ação da insulina nas células ocorre por meio da sua ligação a um receptor específico na membrana celular, composto por duas subunidades α e duas subunidades β . Ao ocorrer essa interação, a subunidade β adquire atividade quinase, levando à alteração conformacional e à autofosforilação, além da fosforilação de vários substratos proteicos em tirosina, incluindo algumas proteínas IRS (Substrato do Receptor de Insulina). Essas proteínas IRS possuem uma importante função reguladora entre os receptores de insulinas e os efeitos moleculares causados pela cascata de sinalização, assim como influenciam no crescimento das células β -pancreáticas e de células somáticas do tecido adiposo, muscular e hepático (KAHN et al., 2014).

No DM2 há um comprometimento neste mecanismo, podendo ser resultante da resistência à insulina ou da disfunção de células β (STUMVOLL et al., 2005).

2.1.2.1. Mecanismos celulares de resistência à insulina

A resistência à insulina está presente quando seus efeitos biológicos apresentam-se comprometidos, havendo declínio no transporte de glicose para o interior das células associado ao aumento da síntese hepática deste monossacarídeo e de lipólise (ANTUNA-PUENTE et al., 2011).

Um dos mecanismos moleculares que justificam essa resistência é o fenômeno de regulação negativa, em que há o desequilíbrio entre a biossíntese e a degradação do receptor da insulina. Esse desequilíbrio resulta de níveis elevados de insulina, que aumentam a internalização do complexo receptor-substrato, e com isso, desencadeiam a degradação de insulina. Neste fenômeno, alguns dos receptores que seriam reciclados e retornariam à membrana acabam sendo degradados juntamente com o hormônio (CAPEAU, 2008).

Além disso, há o interrompimento da cascata de ação da insulina por sinais celulares ou fatores externos. Entre esses, há o aumento da fosforilação de serina das proteínas IRS pela fosfotirosinafosfatase 1B e a desfosforilação das cadeias laterais de tirosina pela tirosinofosfatase. Essas ações conduzem à redução do acoplamento dessas proteínas com os receptores de insulina (CAPEAU, 2008).

Em adição a essas moléculas que atuam em nível extracelular, existem também mecanismos intracelulares envolvidos, como a disfunção mitocondrial. Essa disfunção pode ser de origem genética, sendo encontrada em familiares de portadores de DM2, induzida por certos fármacos que atuam no fígado, ou pode estar vinculada ao processo de envelhecimento. Nesta situação, há um aumento de fibras musculares do tipo 11-B (tipo não oxidativo) e redução do número de mitocôndrias do músculo esquelético. Isto causa um declínio na oxidação de ácidos graxos e na síntese de adenosina trifosfato (ATP), e conseqüentemente, o comprometimento da absorção de glicose muscular e o acúmulo de triglicerídeos (TG) (LEAHY, 2005; CAPEAU, 2008).

Outro fator associado à resistência de insulina é a obesidade, frequentemente presente em pacientes com DM2. Neste caso, há aumento de TG armazenados visceralmente e em depósitos subcutâneos no organismo, gerando adipócitos que causam a produção de proteínas denominadas

adipocinas. Essas proteínas possuem efeitos periféricos em vários tecidos, incluindo o hepático e o muscular esquelético. Dentre elas, destacam-se o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). A primeira aumenta a lipólise nos adipócitos, elevando assim o nível de ácidos graxos não esterificados, enquanto a segunda eleva a expressão das proteínas supressoras de citocinas participantes da degradação de proteína IRS (LEAHY, 2005).

Associado a esses fatores, há o aumento da lipólise, que eleva o nível plasmático de glicerol e ácidos graxos não esterificados. Estes agem inibindo o metabolismo de carboidratos, além de estimular a gliconeogênese e ativar as quinases celulares responsáveis pelo aumento da fosforilação dos resíduos de treonina e serina da proteína IRS (STUMVOLL et al., 2005).

2.1.2.2. Disfunção das células β

A perda da função de células β ocorre em duas fases, sendo a primeira etapa anterior à detecção do diabetes e decorrente de defeitos intrínsecos dessas células. A segunda ocorre após o desenvolvimento de quadros acelerados de hiperglicemia, como consequência de alterações metabólicas, como a glicotoxicidade e lipotoxicidade (LUPI; PRATO, DEL, 2008).

A glicotoxicidade consiste na elevação crônica da concentração plasmática de glicose, prejudicando tanto a sensibilidade da insulina, quanto a função das células β . O metabolismo excessivo deste carboidrato causa estresse oxidativo pelo aumento da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio; assim como dificulta a secreção de insulina por comprometer a transcrição de pró-insulina; e ativa a apoptose. Esse processo de apoptose resulta da perturbação mitocondrial ocasionada por radicais livres de oxigênio, do estresse do retículo endoplasmático, ou pela presença de mediadores indutores, como certas citocinas conhecidas como caspases. Como a massa de células β resulta de um equilíbrio dinâmico entre sua expansão e a redução, em casos de aumento de apoptose, há redução de massa de célula β , característico em pacientes com DM2 (LEAHY, 2005; LUPI; PRATO, DEL, 2008).

Ainda, em situação com maior disponibilidade de glicose, outras vias são ativadas, como a biossíntese de hexosamina. Essa via leva à ativação

prejudicada do receptor de insulina com as proteínas IRS (LUIPI; PRATO, DEL, 2008).

Já a lipotoxicidade representa a expansão do tecido adiposo e é responsável por causar uma resposta inflamatória, caracterizada pelo aumento da liberação de mediadores inflamatórios como a leptina, TNF- α e IL-6. Estes mediadores afetam a fisiologia da célula β e aumentam a apoptose e a expressão de oxidonitrosintase, aumentando assim a síntese de óxido nítrico (LEAHY, 2005).

Outro fator vinculado à disfunção dessas células seria a presença de placas amiloides nas ilhotas de pacientes com DM2. Essas placas são decorrentes do acúmulo de amilina, um peptídeo de 37 aminoácidos que é co-secretado e empacotado com a insulina. Esta formação de depósitos de amilina tem efeito citotóxico por produzirem radicais livres (STUMVOLL et al., 2005).

2.1.3. Epidemiologia

O diabetes está em ascensão no mundo todo e, conforme a *International Diabetes Federation* (IDF), atualmente 415 milhões de pessoas no mundo apresentam esse distúrbio metabólico. A maioria dos afetados apresenta entre 40 e 59 anos e 80% reside em países de baixa e média renda. Estima-se ainda que existam 193 milhões de casos não diagnosticados. Além disso, acredita-se que essa doença acometerá 642 milhões de pessoas até 2035 (IDF/SBD, 2014; IDF, 2015).

Um fator relevante vinculado a esta enfermidade é a alta taxa de mortalidade. Em 2014, aproximadamente 5 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos morreram de complicações relacionadas ao diabetes. Além disso, essa doença apresenta alto custo, que foram de aproximadamente 673 bilhões de dólares, representando 11% dos gastos totais na saúde do adulto no ano de 2014 (IDF/SBD, 2014; IDF, 2015).

O Brasil permaneceu como o quarto país com maior número de pessoas entre 20 e 79 anos com DM em 2014. Neste mesmo ano, aproximadamente 14,3 milhões de pessoas foram acometidas pela doença, sendo que o número de mortes foi de 116.383 (IDF/SBD, 2014; IDF, 2015).

2.2. TRATAMENTO

Com o intuito de normalizar o índice glicêmico, inicialmente são realizadas intervenções não medicamentosas, como a mudança do estilo de vida, incluindo atividades físicas regulares e uma alimentação adequada. Essas alterações podem desencadear a perda de peso, que favorece o controle glicêmico e a melhora de fatores de riscos cardiovasculares (INZUCCHI et al., 2012; SBD, 2015; ADA, 2015).

Contudo, quando somente as recomendações nutricionais e a atividade física não são eficazes para manter os níveis de HbA_{1c} inferiores a 6,5%, o tratamento farmacológico oral é recomendado (SBEM, 2004; SBD, 2015). A escolha do tratamento é centrada tanto na individualização do tratamento, quanto nos níveis glicêmicos e possíveis comprometimentos (INZUCCHI et al., 2012; SBD, 2014; AACE/ACE, 2015; ADA, 2015).

Frente a grande quantidade de agentes terapêuticos para o diabetes disponíveis e visando a orientar os prescritores na definição da conduta terapêutica, existem algoritmos disponíveis pela ADA (*American Diabetes Association*), AACE/ACE (*American Association of Clinical Endocrinologists/ American College of Endocrinology*), EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) e a SBD (*Sociedade Brasileira de Diabetes*) (INZUCCHI et al., 2012; AACE/ACE, 2015; SBD, 2015; ADA, 2015).

No Brasil, estão disponíveis comercialmente sete classes de agentes antidiabéticos orais (SBD, 2015). Com finalidade prática, a sociedade brasileira de diabetes classifica os antidiabéticos orais em quatro categorias: anti-hiperglicemiantes, hipoglicemiantes, os que aumentam a secreção de insulina de forma dependente da glicose e os que promovem a glicosúria (SBD, 2015).

2.2.1. Anti-hiperglicemiantes

Esses medicamentos são pouco vinculados a quadros de hipoglicemia, por não promoverem o aumento da secreção de insulina (SBD, 2015). Fazem parte desse grupo:

2.2.1.1. Biguanidas

A metformina consiste no único medicamento comercialmente disponível dessa classe, devido a fenformina e a buformina serem proibidas por estarem relacionadas a quadros de acidose láctica. A sua monoterapia é considerada o tratamento de primeira escolha para o tratamento de DM2, reduzindo HbA_{1c} em 1,5 a 2%, entretanto, em muitos casos, acaba sendo associado a outros agentes hipoglicemiantes, como as sulfonilureias (IDF, 2012).

Este fármaco atua melhorando a sensibilidade periférica à insulina, além de inibir a absorção gastrointestinal de glicose e a gliconeogênese hepática. Como não estimula a secreção de insulina, não causa quadros de hipoglicemia, mesmo que em grandes doses (DAVIDSON et al., 1997).

As vantagens do seu uso são redução de complicações vasculares e de retinopatia e a alteração do perfil lipídico, ao diminuir lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, e aumentar os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (ANDÚJAR-PLATA et al., 2012).

2.2.1.2. Tiazolineodionas ou glitazonas

Atuam sensibilizando a ação da insulina tanto em tecidos periféricos quanto a nível hepático, por se ligarem a receptores nucleares PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissomo). Estes receptores induzem a transcrição de genes vinculados ao metabolismo glicídico e lipídico e a expressão de proteínas inflamatórias e endoteliais (GOMES, 2006; DÜFER et al., 2013).

As glitazonas desencadeiam a redução de aproximadamente 1,0 a 1,4% de HbA_{1c} e podem ser usadas tanto como monoterapia, quanto associadas a outras classes, como biguanida, sulfonilureias e insulina. Porém, o seu uso pode levar ao ganho de peso e a retenção de fluído, não sendo indicadas assim para pacientes com insuficiência cardíaca sintomática (OVALLE, 2011).

Em 2010, a *European Medicines Agency* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) suspenderam a comercialização de rosiglitazona nos países europeus e no Brasil, respectivamente, devido à correlação do uso

deste fármaco com possíveis comprometimentos cardíacos, como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e derrame. Todavia, nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) somente restringiu a sua indicação (NISSEN; WOLSKI, 2007; J.-M. M., 2014; NWOKIKE et al., 2014; SBD, 2015).

2.2.1.3. Inibidores de α -glicosidase

Retardam a absorção de hidratos de carbono por inibirem competitivamente as enzimas α -glicosidase presente no intestino delgado, que seriam responsáveis por hidrolisar dissacarídeos e oligossacarídeos em monossacarídeos. A partir disso, interferem nos níveis de glicose e insulina pós-prandial, diminuindo 0,5% a 1,0% os níveis de HbA_{1c} (LAAR et al., 2005; SBD, 2015).

Nesse grupo farmacológico, destacam-se a acarbose, miglitol e voglibose. Embora essa classe seja bem tolerada, pode expressar alguns efeitos adversos gastrointestinais, como flatulência, desconforto abdominal e diarreia (OVALLE, 2011).

2.2.2. Hipoglicemiantes

São os secretagogos de insulina, sendo subdivididos conforme o tempo de ação.

2.2.2.1. Sulfonilureias

Compreendem a segunda classe de antidiabéticos orais mais utilizados (28,9% dos tratamentos), havendo os agentes mais antigos, denominados como de primeira geração, como a tolbutamida e a clorpropamida; os de segunda geração, destacando-se a glibenclamida e a gliclazida, e o de terceira geração, que inclui a glimepirida (KHAN et al., 2014).

Sulfonilureias são secretagogos de insulina. Atuam sobre canais de potássio dependentes de ATP nos receptores da superfície de células β -

pancreáticas, levando à despolarização da membrana celular, e, conseqüentemente, ao influxo de cálcio para o meio intracelular. Contudo, essa ação ocorre independente do nível glicêmico, podendo levar ao efeito adverso de hipoglicemia, principalmente em idosos, (BAILEY, 2013).

Apresentam ação prolongada durante o dia e diminuem de 1,5% a 2,0% os níveis de HbA_{1c} (BAILEY, 2013). As desvantagens do seu uso, além dos possíveis quadros de hipoglicemia, consistem no ganho de peso e possível correlação da sua monoterapia com doenças cardiovasculares (NATHAN et al., 2009).

2.2.2.2. Glinidas ou metilglinidas

Classe de agentes insulínótropicos de ação rápida, constituída pela nateglinida e repaglinida, com meia-vida de uma a duas horas. São recomendados principalmente para a redução dos níveis glicêmicos pós-prandiais (MORENO PÉREZ et al., 2008).

As glinidas desempenham sua ação em canais de potássio sensíveis a ATP presentes nas células β -pancreáticas, provocando a despolarização da membrana, o influxo de cálcio e a exocitose dos grânulos de secreção contendo insulina (TAKAHASHI et al., 2007). Reduzem de 0,5% a 1,5% os níveis de HbA_{1c}. Destacam-se como efeitos adversos o ganho ponderal e a hipoglicemia (OVALLE, 2011).

2.2.3. Agentes que aumentam a secreção de insulina dependente de glicose e que diminuem a secreção de glucagon

2.2.3.1. Gliptinas

Classe de antidiabéticos orais composta pela vildagliptina, alogliptina, sitagliptina, linagliptina e saxagliptina (DUEZ et al., 2012). São responsáveis por inibir a enzima dipeptidil peptidase quatro (DPP-4), presente em vários tecidos e com papel essencial na homeostasia da glicose, na pressão sanguínea, na

inflamação neurogênica e no sistema imunológico. Ao desencadear o bloqueio da enzima DPP-4, promovem o aumento de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), que, por sua vez, liga-se ao receptor na membrana da célula β , causando o aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) e, conseqüentemente, o influxo de cálcio e a secreção de insulina (WU et al., 2009; KSHIRSAGAR et al., 2011).

Ao serem usados como monoterapia, promovem redução de 0,6 a 0,8% da concentração de HbA_{1c}. Como efeitos adversos, podem ocorrer hipoglicemia e quadros de náuseas (WAUGH et al., 2010).

2.2.4. Agentes que promovem a glicosúria

2.2.4.1. Inibidores de SGLT-2

Representa uma nova opção terapêutica oral, apresentando mecanismo de ação diferenciado das demais classes. Bloqueia o cotransporte de sódio e glicose pelo receptor SGLT-2 (transportador de sódio e glicose 2) a nível de túbulo proximal renal. A partir disso, há o bloqueio da reabsorção renal de glicose, intensificando a glicosúria e reduzindo o nível glicêmico (ALBARRÁN; AMPUDIA-BLASCO, 2013).

A redução da glicotoxicidade melhora a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos e os níveis glicêmicos em jejum e pós-prandial, leva à preservação funcional das células β pancreáticas, à redução dos níveis de HbA_{1c} e à secreção de insulina pelas células β (SCHEEN; PAQUOT, 2013).

Outros efeitos vinculados a esses fármacos são a redução de peso e da pressão arterial, principalmente pelo aumento de excreção de íon sódio (PUIG-DOMINGO; PELLITERO, 2014). No entanto, as desvantagens do seu uso são a hiperfagia compensatória, diarreia, dores de cabeça e favorecimento da infecção do trato urinário e genital (SCHEEN; PAQUOT, 2013; ALBARRÁN; AMPUDIA-BLASCO, 2013).

No Brasil, em 2013, foi aprovado pela ANVISA para comercialização o primeiro representante desta classe, a dapagliflozina. Todavia, atualmente os

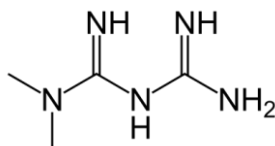
representantes comercialmente disponíveis dessa classe são além da dapagliflozina, a canagliflozina e empagliflozina.

2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS

Para representar as principais classes terapêuticas utilizadas no tratamento do diabetes, com base nos algoritmos da ADA, AACE/ACE, EASD e da SBD, foram definidos os seguintes analitos como foco do estudo: metformina (biguanida), clorpropamida (sulfonilureia de primeira geração), glibenclamida e gliclazida (sulfonilureias de segunda geração), glimepirida (sulfonilureia de terceira geração), nateglinida (glinida), vildagliptina (gliptina); e pioglitazona e rosiglitazona (tiazolineodionas) (INZUCCHI et al., 2012; SBD, 2014; AACE/ACE, 2015; ADA, 2015).

A metformina (CAS= 657-24-9) (Figura 1), única da classe biguanida comercialmente disponível, é um pó cristalino branco ou quase branco, facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em acetona, cloreto de metileno, éter etílico e clorofórmio. O seu pKa é de 12,4 e a faixa de fusão, entre 222 a 226°C. A fórmula molecular é C₄H₁₁N₅ e o seu massa molecular é 129,1636 g.mol⁻¹. A massa exata e monoisotópica é 129,101445 g.mol⁻¹ (BRASIL, 2010).

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA METFORMINA OU N,N-DIMETILBIGUANIDA.



METFORMINA

N,N-dimetilbiguanida

FONTE: O autor (2016)

Como representante das sulfonilureias de primeira geração, foi selecionada a clorpropamida (CAS=94-20-2). Esta é encontrada sob a forma de

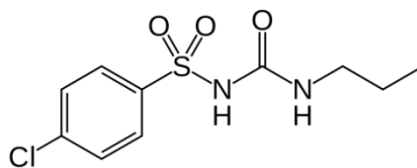
um pó cristalino branco, facilmente solúvel em acetona e cloreto de metileno, solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água. A faixa de fusão da clorpropamida é entre 126 a 130 °C e o pka é 4,33. A fórmula molecular é $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$ e sua massa molecular e massa monoisotópica são 276,740 $g.mol^{-1}$ e 276,0334 $g.mol^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2010).

Em relação às sulfonilureias de segunda geração, foram escolhidas a glibenclamida e a gliclazida. A glibenclamida (CAS=10238-21-8) consiste em um pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro e praticamente insolúvel em água e éter etílico, pouco solúvel em etanol, metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em cloreto de metileno e solúvel em dimetilformamida. Sua faixa de fusão é de 169 a 174 °C e seu pKa é 4,32. Apresenta a fórmula molecular $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$, com massa molecular e massa monoisotópica de 494,004 $g.mol^{-1}$ e 493,1438 $g.mol^{-1}$, respectivamente. Já a gliclazida (CAS=21187-98-4) é um pó cristalino branco ou quase branco, sua fórmula é $C_{15}H_{21}N_3O_3S$, com pKa de 4,07, massa molecular de 323,411 $g.mol^{-1}$ e massa exata de 323,1303 $g.mol^{-1}$. Quanto à solubilidade, é praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em acetona e facilmente solúvel em cloreto de metileno (BRASIL, 2010).

Como sulfonilureia de terceira geração, foi incluída a glimepirida (CAS=93479-97-1), com fórmula molecular de $C_{24}H_{34}N_4O_5S$, massa molecular de 490,616 $g.mol^{-1}$, massa exata de 490,2249 $g.mol^{-1}$ e pka de 4,32. É praticamente insolúvel em água, fracamente solúvel em cloreto de metileno, ligeiramente solúvel em metanol e solúvel em dimetilformamida, ou em hidróxidos alcalinos e ácidos diluídos (BRASIL, 2010).

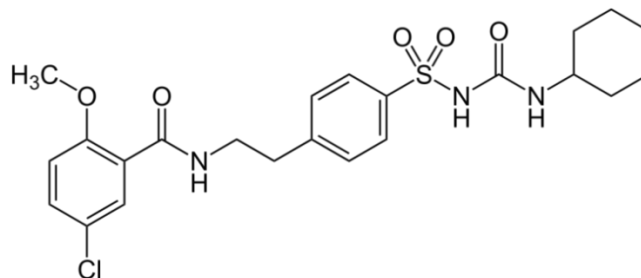
As estruturas químicas da clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, e glimepirida são apresentadas na Figura 2.

FIGURA 2 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA CLORPROPAMIDA (A), GLIBENCLAMIDA (B), GLICLAZIDA (C) E GLIMEPIRIDA (D)



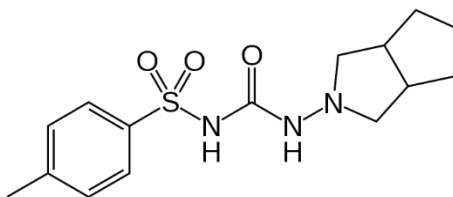
A) CLORPROPAMIDA

1-(4-clorofenil)sulfonil-3-propilureia



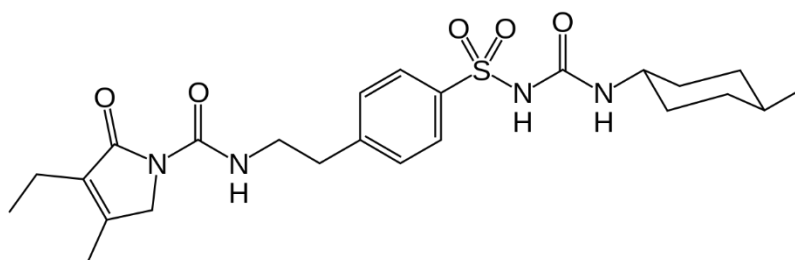
B) GLIBENCLAMIDA

5-cloro-N-[2-[4-(ciclohexilcarbamoilsulfamoil)fenil]etil]-2-metoxibenzamida



C) GLICLAZIDA

1-(3,3a,4,5,6,6a-hexahidro-1H-ciclopenta[c]pirrol-2-il)-3-(4-metilfenil)sulfonilureia



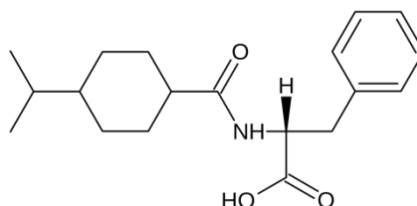
D) GLIMEPIRIDA

4-etil-3-metil-N-[2-[4-(4-metilciclohexil)carbamoilsulfamoil]fenil]etil]-5-oxo-2H-pirrole-1-carboxamida

FONTE: O autor (2016)

A nateglinida (CAS=105816-04-4) (Figura 3), representante da classe das glinidas, é muito solúvel em metanol, etanol e em clorofórmio, solúvel em éter e fracamente solúvel em acetonitrila, octanol e água. Apresenta pKa de 4,0 e fórmula molecular $C_{19}H_{27}NO_3$. A sua massa molecular e massa exata são $317,4226 \text{ g.mol}^{-1}$ e $317,1990 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2010).

FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE NATEGLINIDA



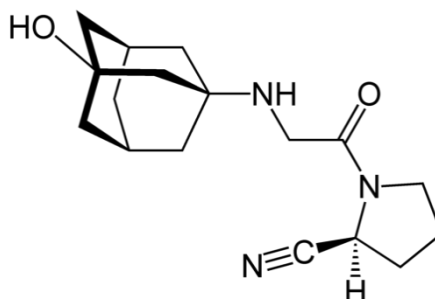
NATEGLINIDA

(2S)-3-fenil-2-[(4-propan-2-ilciclohexanocarbonil)amino]ácido propanóico

FONTE: O autor (2016)

A vildagliptina (CAS=274901-16-5) é um composto branco, ou ligeiramente amarelado, com ponto de fusão de aproximadamente $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pKa de 9,0. É facilmente solúvel em água e em dimetilsulfóxido. A fórmula molecular é $C_{17}H_{25}N_3O_2$ e a massa molecular é $303,3993 \text{ g.mol}^{-1}$. A massa exata e monoisotópica é $303,1946 \text{ g.mol}^{-1}$. A estrutura química da vildagliptina é apresentada na Figura 4.

FIGURA 4 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA VILDAGLIPTINA



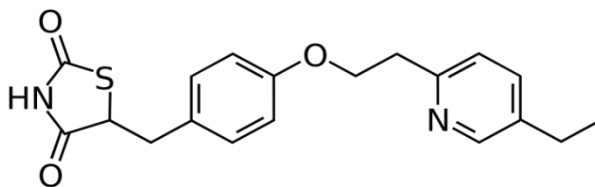
VILDAGLIPTINA

(2S)-1-[N-(3-hidroxi-1-adamantil)glicil]pirrolidina-2-carbonitrila

FONTE: O autor (2016)

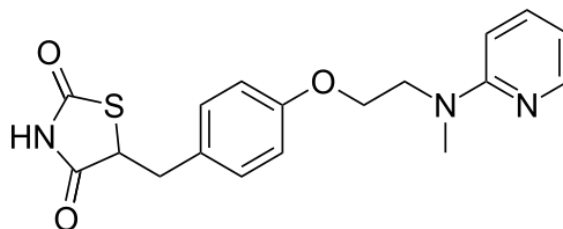
Para as glitazonas, foram selecionadas a pioglitazona e a rosiglitazona (Figura 5). A pioglitazona (CAS=112529-15-4) é solúvel em *N,N*-dimetilformamida, ligeiramente solúvel em etanol anidro, acetona e acetonitrila, praticamente insolúvel em água e insolúvel em éter. A faixa de fusão é de 193 a 194°C e o pKa é 6,66. A fórmula molecular é C₁₉H₂₀N₂O₃S e a massa molecular e a massa monoisotópica são 356,439 g.mol⁻¹ e 356,1194 g.mol⁻¹, respectivamente. Já a rosiglitazona (CAS=122320-73-4) apresenta como fórmula molecular C₁₈H₁₉N₃O₃S, peso molecular de 357,427 g.mol⁻¹ e massa exata de 357,1147 g.mol⁻¹, com pKa de 6,84 e faixa de fusão de 122 a 123°C (BRASIL, 2010).

FIGURA 5 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA PIOGLITAZONA (A) E ROSIGLITAZONA (B)



A) PIOGLITAZONA

5-[[4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona



B) ROSIGLITAZONA

5-[[4-[2-[metil(piridin-2-il)amino]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona

FONTE: O autor (2016)

2.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Amostras biológicas não são diretamente compatíveis com análises cromatográficas, devido a seu alto teor proteico e complexidade. Sendo assim, a preparação de amostras é um processo essencial para adequá-las ao método analítico sem comprometer sua integridade (CHEN et al., 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). A preparação visa a remover interferentes da matriz e ajustar a concentração dos compostos de interesse. Desta forma, garante a sensibilidade do método e a compatibilidade da matriz com a técnica bioanalítica, além de preservar a integridade da coluna cromatográfica e do instrumento analítico (CHEN et al., 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A preparação de amostras biológicas tem sido convencionalmente realizada utilizando um processo de extração, que deve gerar uma perda mínima amostral, boa recuperação dos analitos e eficiência na remoção de componentes indesejáveis. Dentre os processos de extração, destacam-se a extração líquido-líquido (LL), a extração em fase sólida (EFS) e a extração por precipitação de proteínas (PP) (CHEN et al., 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de preparação amostral, na qual há o particionamento da amostra entre duas fases imiscíveis, sendo uma apolar e outra polar. Assim, nos casos em que o analito apresenta maior afinidade com a fase apolar, este pode ser recuperado por evaporação do solvente, enquanto que os solubilizados na fase aquosa podem ser diretamente injetados no sistema (KATAOKA, 2003; CHEN et al., 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A técnica LL, apesar de ser simples e resultar em alta recuperação, gera um alto consumo de solvente, levando ao problema de descarte de resíduos orgânicos, que é prejudicial ao meio-ambiente. Além disso, requer o uso de solventes de alta pureza e pode causar formação de emulsão (KATAOKA, 2003; CHEN et al., 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A extração em fase sólida é considerada o método mais popular de preparação de amostras em bioanálises, apresentando um vasto campo de aplicação. Baseia-se na adsorção dos compostos de interesse entre uma fase líquida (com a amostra) e uma estacionária, sendo que os principais dispositivos empregados para a EFS são os cartuchos e os discos de extração (HENNION,

1999; BLAHOVÁ; BRANDŠTETEROVÁ, 2004; ORLANDO et al., 2009; WAL et al., 2010).

A EFS apresenta como vantagens excelente recuperação e concentração dos analitos, redução no uso de solventes orgânicos quando comparado à extração LL, fácil automação, grande variedade de adsorventes disponíveis, não formação de emulsão e adsorção seletiva. Entretanto, o alto custo de análise, a baixa reprodutibilidade em alguns casos, a dificuldade no controle da velocidade de eluição da amostra e a complexidade no desenvolvimento do método são limitações dessa técnica (HENNION, 1999; BLAHOVÁ; BRANDŠTETEROVÁ, 2004; ORLANDO et al., 2009; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; WAL et al., 2010).

A extração por precipitação de proteínas é realizada por meio da adição de solventes orgânicos (normalmente acetonitrila ou metanol) na amostra. Representa uma técnica rápida, simples, de baixo custo e amplamente utilizada em amostras plasmáticas. Destaca-se por ser aplicável tanto a compostos hidrofílicos quanto hidrofóbicos simultaneamente (HENNION, 1999; BLAHOVÁ; BRANDŠTETEROVÁ, 2004; ORLANDO et al., 2009; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; WAL et al., 2010).

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS

Os métodos analíticos podem ser classificados em qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos objetivam gerar informações sobre a identidade ou a natureza dos compostos presentes na amostra, enquanto os métodos quantitativos visam a determinar a concentração dos analitos, proporcionando resultados numéricos relacionados à quantidade dos componentes na amostra (SKOOG et al., 2002; VAZ, 2010).

Dentre os métodos quantitativos, existem os métodos utilizando técnicas clássicas ou instrumentais. Na metodologia clássica, a quantificação é realizada por meio de técnicas simples e precisas, como a volumetria e a gravimetria (LAITINEN, 1989; VAZ, 2010). Devido à relativa simplicidade são técnicas ainda muito utilizadas. Já nos métodos instrumentais, outras propriedades físico-químicas são exploradas, como a condutividade elétrica, absorção ou emissão de luz. A grande vantagem destes métodos é a associação com equipamentos

sofisticados, resultantes dos grandes avanços tecnológicos. As técnicas de análise instrumental podem ser agrupadas em três áreas principais: cromatografia, espectroscopia e eletroanalítica (SKOOG et al., 2002; VAZ, 2010).

As técnicas cromatográficas são técnicas de separação baseada na migração diferencial dos compostos de acordo com as interações entre a fase estacionária e móvel, e que podem ser acopladas a detectores. As separações cromatográficas são baseadas em diferentes propriedades, podendo ser classificadas em: adsorção, partição, troca iônica, afinidade e exclusão (DEGANI et al., 1998; MALDANER et al., 2009)

Nas técnicas espectrométricas, a resposta analítica é associada à interação do analito com a radiação eletromagnética. Dentre as técnicas espectrométricas, destacam-se, por maior aplicação, a espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de fluorescência, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (SKOOG et al., 2002; VAZ, 2010).

As técnicas eletroanalíticas são baseadas em processos de oxido-redução, relacionando medidas de quantidades elétricas, tais como corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos. Nessas técnicas, os compostos eletroativos do meio geram uma resposta frente à aplicação de um potencial elétrico para o monitoramento da corrente elétrica, ou para obter o valor do potencial do analito frente ao potencial de um eletrodo de referência. Dentre as técnicas eletroanalíticas, destacam-se a amperometria, voltametria e potenciometria (VAZ, 2010).

2.6. CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia líquida (CL) vem sendo amplamente utilizada nos últimos trinta anos para fins qualitativos e quantitativos. Consiste em uma técnica físico-química de separação, baseada na migração diferencial dos compostos de uma mistura, conforme as interações que ocorrem com a fase móvel e a fase estacionária (TONHI et al., 2002).

Nos últimos anos, houve grandes avanços no campo da cromatografia, associados principalmente ao desenvolvimento de partículas de fase estacionária com diâmetros inferiores a 2,0 μm . Entretanto, ao ser feita a redução do tamanho das partículas, surgem algumas limitações à técnica, como o aumento da pressão e, conseqüentemente, vazão de fase móvel não uniforme. Desta forma, com o intuito de minimizar esses agravamentos, foram lançadas colunas com tamanhos menores e equipamentos aptos a tolerar altas pressões: os cromatógrafos a líquido de ultra eficiência (CLUE) (RUSSO et al., 2008; MALDANER et al., 2009).

A CLUE destaca-se por permitir redução no tempo de análise, uma vez que colunas menores e com menor diâmetro de partícula podem ser utilizadas, redução no volume gasto de fase móvel, maior simetria do pico, maior resolução, detectabilidade e eficiência (NGUYEN et al., 2006; RUSSO et al., 2008; MALDANER et al., 2009; KLIMCZAK; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, 2015).

A cromatografia deve ser associada a diferentes modos de detecção, incluindo a espectrometria de massas (EM). Essa associação combina as vantagens da cromatografia, no caso, a eficiência de separação e a alta seletividade, com as vantagens da espectrometria de massas, a qual fornece a massa molar dos compostos, informações estruturais e também aumenta ainda mais a seletividade de um método quando essas duas técnicas são utilizadas em conjunto (LIM; LORD, 2002).

A espectrometria de massas consiste em uma técnica analítica em que as moléculas são ionizadas, formando íons no modo positivo ou negativo, para posterior detecção com base na sua relação massa/carga (m/z). O espectrômetro de massas é composto fundamentalmente por uma fonte de ionização, um analisador e um detector (LIM; LORD, 2002; KOSTIAINEN et al., 2003).

As fontes de ionização com melhor desempenho no acoplamento CL-EM são a Ionização por *Electrospray* (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), sendo ambas abordagens brandas, em que há a formação de íon $[M+H]^+$ (massa molecular mais um hidrogênio) ou outros adutos no modo positivo e $[M-H]^-$ (massa molecular menos um hidrogênio) ou outros adutos no modo negativo (KORFMACHER, 2005; HOLCAPEK et al., 2008; LANÇAS, 2009).

Na ESI, a amostra é dissolvida em um solvente e submetidas a um tubo capilar mantido em alta voltagem. Ao sair deste capilar, são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que sofrem o processo de dessolvatação, diminuindo seu tamanho a ponto que a densidade das cargas ultrapassa a tensão superficial, tendo a “explosão colômbica” e a formação de gotículas bem menores. Essa explosão é subsequente, chegando a um ponto em que os íons formados fluem para o interior do analisador pelos efeitos de atração eletrostática e pelo vácuo. Essa técnica, pela sua alta robustez, é a forma de ionização mais empregada no acoplamento CL-EM, sendo preferível principalmente para análise de compostos polares, termolábeis, ou compostos que geram íons multiplamente carregados (KORFMACHER, 2005; DASS, 2007; CHIARADIA et al., 2008).

Após a produção de íons, estes serão separados pelos analisadores com base na sua relação m/z (GLISH; VACHET, 2003). Entre eles, destaca-se o quadrupolo-tempo de voo (QTOF), analisador híbrido com elevada resolução (aproximadamente 20000), sensibilidade, velocidade de varredura e ampla faixa de massas analisadas (LEE et al., 1999; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; MA; ZHU, 2009). Neste híbrido, o quadrupolo atua por meio da radiofrequência, focalizando e selecionando os íons em direção à cela de colisão e ao analisador TOF. Na cela de colisão a pressão dos gases será definida de acordo com o método, para que haja a fragmentação do composto de interesse. Em ambos os casos, a cela de colisão focaliza e conduz os íons ao analisador TOF. No TOF, os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados por um campo elétrico até alcançarem o detector. A velocidade alcançada pelo íon acelerado é inversamente proporcional a sua massa analisada (CHERNUSHEVICH et al., 2001; LIM; LORD, 2002; MA; ZHU, 2009).

Ao se comparar o analisador Q-TOF ao triplo quadrupolo (QqQ), que é o analisador mais usado em métodos quantitativos, destacam-se como vantagens a alta capacidade de resolução (erro de massa < 5ppm), permitindo diferenciar até quatro casas decimais após a vírgula, enquanto o QqQ fornece no máximo uma casa decimal; ótima ferramenta de screening, corrige saturações de picos e na literatura existem vários métodos quantitativos desenvolvidos e validados no Q-TOF apresentando exatidão e precisão semelhante ou até mesmo superior ao QqQ (WILLIAMSON; BARTLETT, 2007).

Por fim, os compostos que foram analisados serão detectados por meio de detectores, que são selecionados conforme o tipo de analisador. Para o QTOF, acopla-se o prato microcanal/*microchannel plate detector* (MCP) (LANÇAS, 2009).

2.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Conforme a resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, métodos bioanalíticos caracterizam-se por serem métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas (BRASIL, 2012).

É essencial para esses ensaios que os laboratórios forneçam resultados confiáveis, deste modo, é feita a validação do método. O objetivo da validação é garantir, através de estudos experimentais, que o método é apropriado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2003).

Os parâmetros fundamentais utilizados na validação de métodos bioanalíticos, de acordo com a resolução RDC nº 27/ 2012 da ANVISA e com os guias internacionais para validação de ensaios bioanalíticos da FDA de 2013 e da EMA de 2011 são: seletividade, limite inferior de quantificação, curva de calibração, precisão, exatidão, recuperação, efeito matriz, efeito residual e estabilidade (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

2.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação

O limite de detecção (LD) apesar de não ser recomendado por nenhum dos principais guias bioanalíticos, consiste na menor quantidade do analito que pode ser detectada com confiabilidade, mas não quantificada como um valor exato, ou representa a menor quantidade que pode ser distinguida do ruído de fundo no procedimento bioanalítico (ARAUJO, 2009).

O limite inferior de quantificação (LIQ) é definido como a menor concentração do analito na amostra, podendo ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003; PETERS et al., 2007; TIWARI; TIWARI, 2010).

2.7.2. Seletividade

Considerada o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método. Consiste na capacidade do método em diferenciar o analito de interesse na presença de outros compostos que possam estar presentes na matriz biológica, tais como metabólitos, medicamentos, impurezas, degradantes ou componentes da matriz (FDA, 2013; IUPAC, 2014).

Geralmente, o termo seletividade é designado como sinônimo de especificidade, entretanto, de acordo com a *European Medicines Agency*, são conceitos distintos, a qual, durante a validação, recomenda o parâmetro seletividade (EMA, 2011; GONZÁLEZ et al., 2014).

2.7.3. Curva de Calibração

A curva de calibração consiste na capacidade do procedimento bioanalítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, sendo fundamental que essa relação seja contínua e reprodutível (FDA, 2013).

Com base na linearidade, na aplicação pretendida do método e nos limites de quantificação, é estabelecido o intervalo específico para a curva de calibração. Esse intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação inferior e superior (LSQ) de um método analítico e deve apresentar precisão e exatidão (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

Uma curva de calibração deve ser gerada para cada analito e corrida analítica, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

2.7.4. Controles de qualidade (CQ)

Consistem em amostras da matriz biológica fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos, com o objetivo de monitorar o desempenho do método

bioanalítico e avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas por este método em uma corrida (FDA, 2013).

As amostras de controle de qualidade dentro do procedimento bioanalítico são:

- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz biológica na qual é adicionado o analito em concentração até três vezes o limite inferior de quantificação;
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz biológica que apresenta o analito na concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz biológica com adição do analito para obter uma concentração com valor entre 75-85% da maior concentração da curva de calibração;
- Controle de qualidade de diluição (CQD): Amostra de matriz biológica com adição do analito em concentração que ultrapasse o limite superior de quantificação, analisada por meio de diluição especificada no procedimento bioanalítico;
- Controle de qualidade limite inferior de quantificação (CQ-LIQ): consiste em amostra de matriz com o analito na menor concentração da curva de calibração.

2.7.5. Precisão e Exatidão

A precisão reflete o grau de concordância entre os valores obtidos através da repetição de um procedimento experimental, sob condições específicas. Quanto maior a proximidade dos resultados das múltiplas mensurações, mais preciso o procedimento (ICH, 2005; IUPAC, 2014). O resultado é expresso por meio do desvio padrão relativo (DPR), também denominado como coeficiente de variação (CV) (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

A exatidão corresponde à concordância entre o resultado obtido de uma medição em relação ao seu valor considerado como referência (IUPAC, 2014). Este ensaio bioanalítico é expresso pelo Erro Padrão Relativo (EPR) (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

2.7.6. Recuperação

A recuperação mensura a eficiência do processo de extração, ou seja, avalia a capacidade do método de preparação de amostra em extrair os analitos a partir das amostras biológicas. Este parâmetro é usualmente relatado em porcentagem. Os guias da EMA e da ANVISA não requerem a determinação deste parâmetro, sendo recomendada somente pelo guia da FDA (FDA, 2001, 2013; BRASIL, 2003, 2012; EMA, 2011).

2.7.7. Efeito matriz

Representa o efeito que outros compostos presentes na matriz podem apresentar sobre a quantificação do analito (SHAH et al., 2000). Este critério está vinculado à seletividade da técnica. Em técnicas pouco seletivas, como a fotometria, os interferentes normalmente aparecem na forma de picos visíveis. Já em técnicas mais seletivas, como a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas, os interferentes podem não ser visíveis na razão massa carga ou transição monitorada e desencadear a supressão ou o aumento do sinal, alteração da linha de base, formação de cauda na saída cromatográfica, além de impactar no tempo de retenção do analito (GONZÁLEZ et al., 2014).

2.7.8. Efeito residual

Consiste no efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou do padrão interno, proveniente da contaminação por amostras analisadas anteriormente. Este fenômeno ocorre principalmente em análises de amostras subsequentes ou após a injeção de amostras concentradas. O ensaio visa a garantir que análises anteriores não comprometam os resultados de outras corridas analíticas (VIEIRA et al., 2013).

2.7.9. Estabilidade

A instabilidade do fármaco e seus metabólitos em matriz biológica está associada com suas propriedades físico-químicas, uso de medicamentos concomitantes, componentes da matriz e às condições às quais o fármaco foi submetido durante armazenamento e análise. Assim, visando conhecer o comportamento das substâncias de interesse em solução e em matriz biológica e para obter resultados confiáveis, torna-se fundamental avaliar a estabilidade do analito durante o processo de validação. Para isso, são realizados testes que reproduzem as condições de armazenamento, preparo e processamento das amostras, utilizando um conjunto de matriz biológica fortificada com o padrão interno e analitos, assim como padrões em solução (CASSIANO et al., 2009; EMA, 2011; BRASIL, 2012).

2.8. REVISÃO SISTEMÁTICA

A revisão sistemática é uma revisão planejada da literatura científica sobre um determinado assunto. Representa uma metodologia moderna que visa a reunir estudos semelhantes, avaliando-os quanto a um conjunto de dados. Deste modo, a revisão sistemática permite identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos, e também coletar, analisar e comparar os dados fornecidos por eles (ATALLAH; CASTRO, 2005; UMAN, 2011). Os resultados podem ser coincidentes ou conflitantes, sendo úteis para indicar o que já se sabe e o que ainda não foi esclarecido sobre o assunto, o que auxilia no planejamento de investigações futuras (CASTRO, 2001; ATALLAH; CASTRO, 2005).

Na revisão sistemática, os métodos de seleção e análise dos dados são definidos anteriormente ao início da revisão. Desta forma, uma estratégia de busca deve ser criteriosamente desenvolvida a fim de responder uma questão específica, a qual corresponde ao objetivo principal do estudo. A estratégia deve ser cuidadosamente formulada de forma adequada, para evitar erros que podem levar a falsos resultados. Além disso, os critérios de inclusão e exclusão de artigos devem ser claramente definidos (KHAN et al., 2003).

Orientações sobre como realizar uma revisão sistemática são encontradas no *Cochrane Handbook*. A Cochrane é uma organização sem fins lucrativos, formada por profissionais da área da saúde, que tem por objetivo reunir evidências geradas por investigações científicas e torná-las úteis para a tomada de decisões em saúde. A Cochrane recomenda que a revisão sistemática seja efetuada em sete etapas: formulação da pergunta, definição da estratégia de busca, busca nas bases de dados, seleção e triagem dos estudos, coleta dos dados, análise e apresentação dos dados e síntese dos dados (GREEN; HIGGINS, 2011).

CAPÍTULO 1 - REVISÃO SISTEMÁTICA

3. INTRODUÇÃO

O monitoramento terapêutico refere-se à prática clínica que permite correlacionar a dose ingerida com a concentração plasmática do fármaco e com os princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização da terapia do paciente e também na individualização da posologia (KANG; LEE, 2009).

As concentrações plasmáticas dos fármacos associadas a outras observações clínicas do estado do paciente são essenciais para caracterizar alterações no estado fisiopatológico do indivíduo, a adesão do paciente frente ao tratamento recomendado e a modificação da farmacocinética do fármaco, por exemplo, devido a uma interação farmacológica (GARCÍA-PÉREZ et al., 2013).

Além disso, justifica-se a realização do monitoramento terapêutico devido as seguintes razões: grande variação farmacocinética entre um indivíduo e outro; relação direta entre a concentração do fármaco e a sua ação farmacológica; a pequena margem terapêutica de alguns fármacos; e a disponibilidade de métodos analíticos para doseamento dos fármacos de forma sensível, precisa e exata (KANG; LEE, 2009; GARCÍA-PÉREZ et al., 2013).

Com relação aos antidiabéticos, apesar de serem fármacos com maior margem terapêutica, a importância do monitoramento de associações destes medicamentos decorre do fato de que uma grande parte dos pacientes diabéticos apresentam outras patologias associadas, podendo haver interações medicamentosas ou alterações farmacocinéticas que resultem em alterações nas concentrações dos antidiabéticos e também devido à baixa adesão terapêutica associada à cronicidade do tratamento (WHO, 2003; GARCÍA-PÉREZ et al., 2013).

Considerando a importância do monitoramento terapêutico e do diabetes, vários métodos bioanalíticos com o objetivo de quantificar e monitorar associações de antidiabéticos em sangue humano são encontrados na literatura. Diante disso, e sabendo que ainda não existem revisões sistemáticas associadas a métodos bioanalíticos, o objetivo dessa primeira etapa foi conduzir uma revisão sistemática de métodos desenvolvidos e validados para a quantificação de associações de antidiabéticos orais em amostras de sangue humano, avaliando o conjunto de evidências dos estudos científicos para obter

uma visão geral e confiável do assunto, auxiliando assim, no planejamento de investigações futuras.

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e avaliar os métodos desenvolvidos e validados para quantificar associações de antidiabéticos orais em sangue humano presentes na literatura.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática para a busca de métodos bioanalíticos que contemplem a quantificação de associações terapêuticas de antidiabéticos orais em sangue humano;
- Estruturar tabelas para a realização da coleta de dados;
- Verificar as associações contempladas pelos métodos encontrados na literatura;
- Comparar as diferentes técnicas analíticas, técnicas de preparação de amostra e condições analíticas dos métodos encontrados;
- Avaliar se a validação está de acordo com o preconizado nos principais guias sobre validação de métodos bioanalíticos (FDA, EMA, ANVISA).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA

A fim de reunir evidências sobre os métodos já desenvolvidos e validados para quantificação de associações de antidiabéticos orais em sangue humano, uma busca sistemática na literatura foi realizada, baseada nos sete passos recomendados pela diretriz metodológica internacional “*Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, The Cochrane Collaboration, 2011*” (GREEN; HIGGINS, 2011).

Primeiramente, a pergunta a ser respondida através da revisão sistemática foi formulada: quais são os métodos disponíveis na literatura desenvolvidos e validados para a quantificação simultânea de antidiabéticos orais em sangue humano? Após a definição da pergunta, os critérios de inclusão e exclusão de artigos puderam ser definidos.

4.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídas publicações que apresentassem métodos utilizando qualquer técnica analítica que tenham sido desenvolvidos e validados para a quantificação simultânea de antidiabéticos orais em plasma/soro/sangue humano. Foram incluídos estudos publicados até outubro de 2015, em qualquer idioma (exceto aqueles cujos caracteres não fossem romanos).

A seleção dos medicamentos antidiabéticos presentes na revisão sistemática foi feita com base nos algoritmos da *American Diabetes Association*, da *American Association of Clinical Endocrinologists/ American College of Endocrinology*, da *European Association for the Study of Diabetes* e da Sociedade Brasileira de Diabetes.

4.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas as publicações que apresentaram pelo menos um dos seguintes critérios:

- Métodos desenvolvidos em outras matrizes que não plasma/soro/sangue humano;
- Métodos não validados;
- Métodos validados em solução;
- Métodos desenvolvidos para um único antidiabético;
- Artigos de revisão ou estudos farmacocinéticos em que o método tenha sido apenas aplicado e não desenvolvido;
- Publicações escritas em algarismos não romanos.

4.1.3. Localização dos estudos

A busca pelas publicações foi conduzida nas bases de dados MEDLINE/Pubmed, Web of Science e Scopus, e complementada através de busca manual, por meio da análise das referências dos artigos incluídos.

Para a busca dos trabalhos foram utilizados os seguintes descritores na estratégia de busca: nomes comerciais e genéricos dos medicamentos presentes nos algoritmos representantes das sete classes terapêuticas (biguanidas, tiazolinedionas, inibidores de alfa-glicosidase, sulfonilureias, glinidinas, gliptinas e inibidores de SGLT-2), os termos antidiabéticos orais, antihiperlipicêmicos orais, hipoglicêmicos orais e outros sinônimos; validação, quantificação e sinônimos; plasma, sangue, soro humano e os nomes das técnicas analíticas quantitativas.

Os descritores foram adaptados para cada base de dados e combinados através de operadores booleanos (*OR* e *AND*). As estratégias de busca desenvolvidas para cada base de dados encontram-se no Apêndice 1.

4.1.4. Seleção dos estudos

Dois revisores independentes selecionaram os artigos potencialmente relevantes para a revisão baseados no título e resumo. Se houvesse discordância sobre a inclusão do artigo, um terceiro revisor era consultado. Os artigos selecionados nesta fase foram lidos na íntegra e tiveram seus dados coletados.

4.1.5. Extração dos dados

Os dados foram extraídos em tabelas pré-elaboradas no *Microsoft Office Excel*. Os dados coletados consistiram em data de publicação do estudo, parâmetros analíticos de cada método (técnica analítica, matriz, tratamento da amostra, etc); características específicas de cada método (por exemplo, para espectrometria de massas, foram anotados o modo de ionização e o tipo de analisador) e dados da validação. As tabelas elaboradas para a extração são apresentadas no Apêndice 2.

4.1.6. Síntese dos resultados

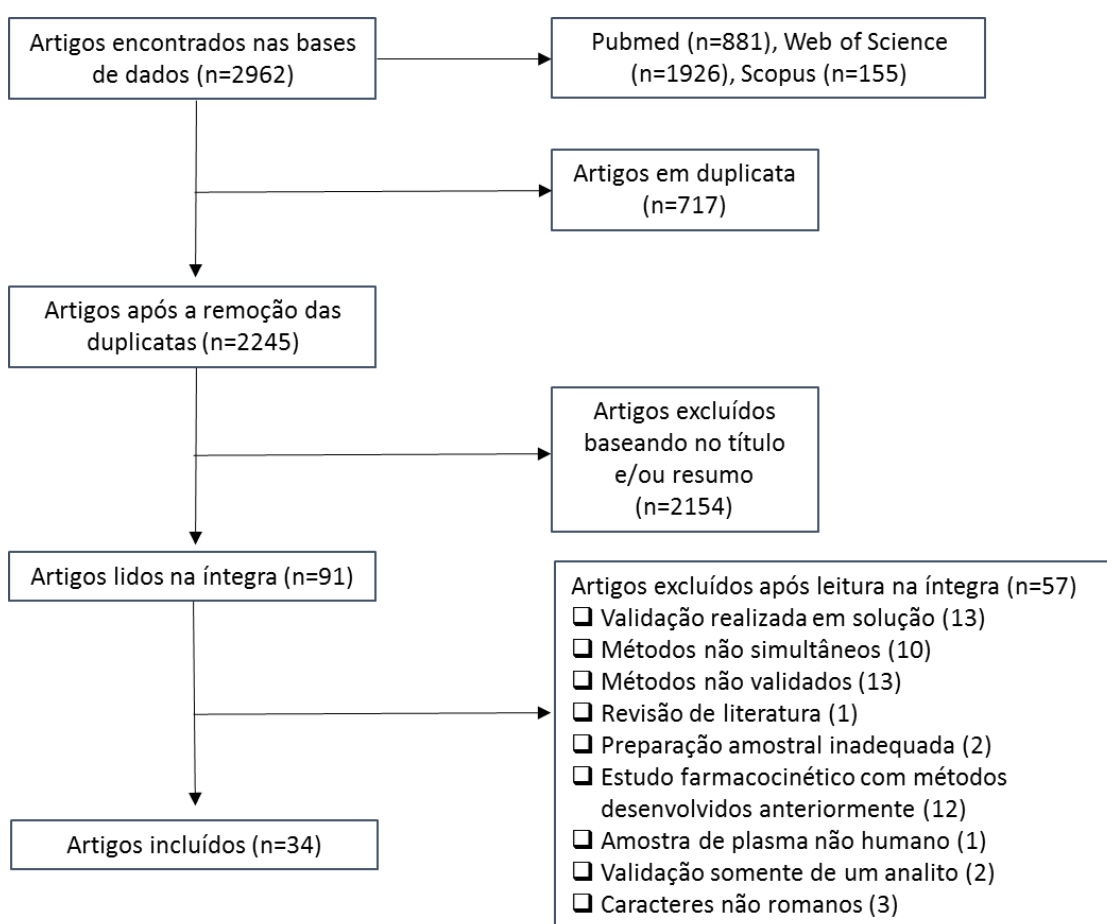
Os resultados foram apresentados de forma descritiva e discutidos de maneira a identificar as técnicas de análise e de preparação de amostras utilizadas, as similaridades e discrepâncias entre os métodos e como os parâmetros de validação foram realizados e apresentados e se estão de acordo com o preconizado pelos principais guias bioanalíticos de validação (FDA, EMA e ANVISA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDOS INCLUÍDOS

Através das estratégias de busca apresentadas no Apêndice 1, foram encontrados 2.962 artigos nas bases de dados. Destes, 717 eram duplicatas, sobrando, então, 2.245 artigos. Após a leitura do título e resumo destes artigos por dois revisores independentes, 91 artigos atenderam aos critérios de inclusão e foram selecionados para a leitura na íntegra. Destes, 34 foram incluídos para a extração dos dados. A Figura 6 representa o processo de seleção dos estudos conforme os critérios de inclusão e exclusão.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE ARTIGOS (FLOWCHART)



FONTE: O autor (2016)

5.2. ESTUDOS EXCLUÍDOS

Dos 57 artigos excluídos após leitura na íntegra, 13 foram eliminados por terem validado o método em solução e posteriormente aplicado em amostras de plasma. Esta abordagem é considerada inapropriada, principalmente devido ao efeito matriz, fator que deve ser considerado durante o desenvolvimento do método bioanalítico. A realização da validação em solução por alguns autores pode ser associada ao fato de estes estudos não seguirem nenhum guia de validação (8 publicações) ou por utilizarem guias de validação analíticos em vez de específicos para métodos bioanalíticos, como o guia da *International Conference on Harmonisation* (ICH).

Além disso, 13 artigos foram excluídos por apresentarem somente o desenvolvimento do método, sem a etapa de validação. A ausência de validação pode ser justificada nestes casos por serem métodos desenvolvidos anteriormente à publicação dos guias de validação (5 publicações); pelos estudos serem qualitativos (métodos de identificação) (3 publicações); e pelo foco do estudo abranger somente o desenvolvimento do método (5 publicações).

Outras razões para a exclusão de artigos foram: desenvolvimento e validação de métodos não simultâneos (10 publicações), ou seja, apesar de terem sido quantificados mais de um antidiabético no estudo, foram utilizados dois métodos diferentes; utilização de amostras de plasma de animais (1 publicação); artigo de revisão de literatura (1 publicação); artigo redigido em algarismos não romanos (3 publicações); validação somente de um analito (2 publicações); estudo farmacocinético com utilização de método previamente desenvolvido e validado (12 publicações) e preparo amostral inapropriado (2 publicações).

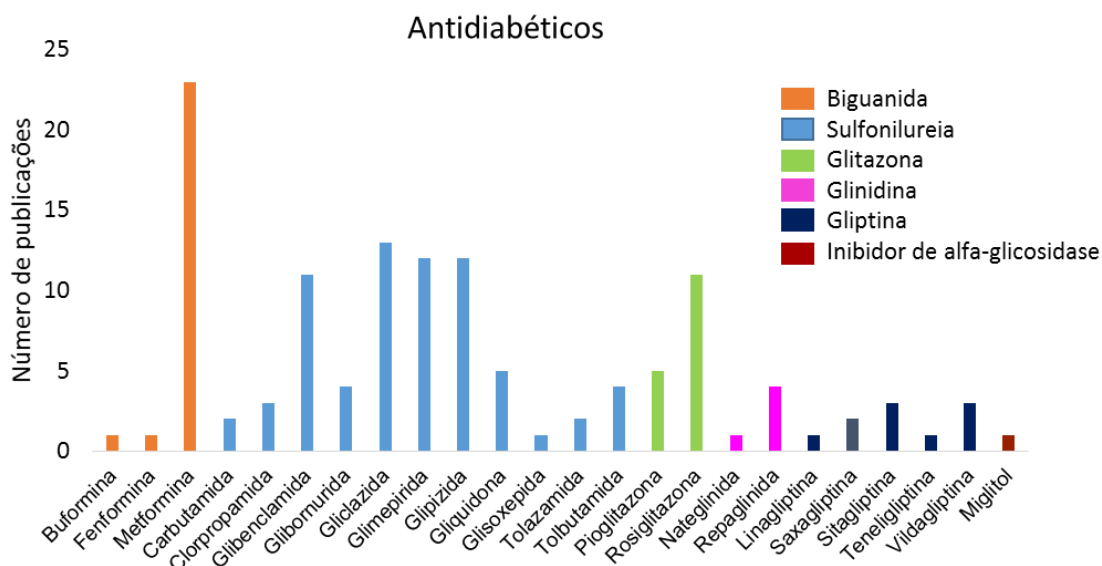
5.3. ANTIDIABÉTICOS ANALISADOS NOS ESTUDOS

Os métodos incluíram um total de 24 agentes antidiabéticos, abrangendo seis classes. Notou-se que não existem na literatura métodos quantitativos para associações de antidiabéticos envolvendo inibidores de SGLT-2. Este fato está possivelmente associado à recente aprovação pela FDA (março de 2013) e EMA

(novembro de 2013) do primeiro representante dos inibidores de SGLT-2, a canagliflozina.

A metformina foi o medicamento que apareceu mais vezes entre os métodos desenvolvidos (23 publicações), seguida pelas sulfonilureias gliclazida (13 publicações), glimepirida (12 publicações), glipizida (12 publicações) e glibenclamida (11 publicações). Estes números são justificados pelo fato de estes fármacos representarem o tratamento de primeira e segunda escolha para o diabetes, respectivamente. O Gráfico 1 apresenta a frequência com que cada antidiabético foi encontrado nos estudos.

GRÁFICO 1 – NÚMERO DE ESTUDOS QUE QUANTIFICARAM CADA UM DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS ENTRE OS MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA



FONTE: O autor (2016)

Grande parte dos métodos (20 publicações) foram desenvolvidos para a quantificação de somente dois analitos, visto que os antidiabéticos apresentam diferentes propriedades físico-químicas. Dentre estas propriedades, destaca-se no caso de métodos cromatográficos a grande diferença na polaridade destes medicamentos, o que dificulta a criação de um método que englobe muitas substâncias. Como exemplo da diversidade de polaridade entre os antidiabéticos, pode-se citar a metformina, altamente polar, com coeficiente de

partição log P de -2,64 e a glibenclamida, altamente apolar, com log P 4,79 (GEORGITA et al., 2007).

Com relação às classes de antidiabéticos, seis artigos incluíram combinações de fármacos da mesma classe, especialmente associações de sulfonilureias (4 publicações). Vinte e quatro estudos envolveram duas classes farmacológicas, destacando-se a associação comumente usada entre uma sulfonilureia e a biguanida metformina (12 publicações). Dois métodos contemplaram três classes de antidiabéticos (glinidina, sulfonilureia e tiazolinediona; meglitinida, sulfonilureia e biguanida) e dois artigos incluíram quatro classes farmacológicas (sulfonilureia, tiazolinediona, gliptina e glinidina e sulfonilureia, biguanida, tiazolinediona e gliptina).

A associação de antidiabéticos contemplada em cada método, assim como a matriz e a técnica analítica utilizada, encontram-se listadas na Tabela 1.

TABELA 1 – DADOS BASAIS DOS MÉTODOS VALIDADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM SANGUE HUMANO ENCONTRADOS NA LITERATURA.

Artigo	Analitos	Matriz	Técnica Bioanalítica
ATTIMARAD et al., 2015	Metformina e miglitol	Plasma	CLAE-EM (ESI)
BEN-HANDER et al., 2015	Metformina e rosiglitazona	Plasma	CLAE (UV)
REDDY et al., 2015	Metformina e sitagliptina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
SHANTIKUMAR et al., 2015	Linagliptina, saxagliptina, sitagliptina, teneligliptina e vildagliptina	Plasma	CLUE-EM/EM (ESI)
NI et al., 2014	Glimepirida e pioglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
PONTAROLO et al., 2014	Metformina e vildagliptina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
RAGO et al., 2014	Glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, rosiglitazona e sitagliptina	Sangue pós-morte	CLAE-EM/EM (ESI)
RASHID et al., 2014	Glibenclamida e metformina	Plasma	CLAE (UV)
VIANA et al., 2014	Clorpropamida, gliclazida e glimepirida	Plasma	CLAE (UV)
JAGADEESH et al., 2013	Metformina e pioglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
LI et al., 2013	Glipizida e metformina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
BINZ et al., 2012	Glibenclamida, gliclazida, glipizida, gliquidona e metformina	Soro	CLAE-EM/EM (ESI)
HEFNAWY et al., 2012	Rosiglitazona e glimepirida	Plasma	CE (DAD)
SØRENSEN, 2012	Buformina, metformina e fenformina	Sangue pós-morte	CLAE-EM/EM (ESI)
CHEN et al., 2011	Metformina e rosiglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)

(CONCLUSÃO) TABELA 1 – DADOS BASAIS DOS MÉTODOS VALIDADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM SANGUE HUMANO ENCONTRADOS NA LITERATURA.

Artigo	Analitos	Matriz	Técnica Bioanalítica
GONZALEZ et al., 2011	Carbutamida, glibenclamida, glibornurida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, metformina, repaglinida, rosiglitazona, tolazamida e tolbutamida	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
HESS et al., 2011	Glibenclamida, glibornurida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisoxepida, nateglinida, repaglinida, rosiglitazona e pioglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
AGRAWAL et al., 2010	Gliclazida e metformina	Plasma	SFC-EM/EM
MAIER et al., 2009	Glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, repaglinida e tolbutamida	Plasma	CE (DAD)
RANETTI et al., 2009	Gliclazida e metformina	Plasma	CLAE (UV)
SENGUPTA et al., 2009	Glimepirida, metformina e pioglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
TIRUMALA; LAKSHMI, 2009	Gliclazida, glimepirida, glipizida, pioglitazona, repaglinida e rosiglitazona	Plasma	CLAE (UV)
JINGAR et al., 2008	Glimepirida e rosiglitazona	Plasma	CLAE (UV)
DING et al., 2007	Glipizida e metformina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
GEORGITA et al., 2007	Glibenclamida e metformina	Plasma	CLAE-EM/EM (APCI)
MISTRI et al., 2007	Glibenclamida e metformina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
YARDIMCI et al., 2007	Metformina e rosiglitazona	Plasma	CLAE (UV)
ZHANG et al., 2007	Metformina e rosiglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
ABURUZ et al., 2005	Glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida e metformina	Plasma	CLAE (UV)
HOIZEY et al., 2005	Carbutamida, clorpropamida, glibenclamida, glibornurida, gliclazida, glimepirida, glipizida e tolbutamida	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
ZHONG et al., 2005	Gliclazida e metformina	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
LIN et al., 2004	Glipizida e rosiglitazona	Plasma	CLAE-EM/EM (ESI)
MAURER et al., 2002	Glibenclamida, glibornurida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisoxepida, tolazamida e tolbutamida	Plasma	CLAE-EM (APCI)
MAGNI et al., 2000	Clorpropamida, glibenclamida, glipizida e tolbutamida	Soro	CLAE-EM (ESI)

NOTA: UV, ultravioleta; CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência; CLUE, cromatografia líquida de ultra eficiência; SFC, cromatografia em fluido supercrítico; EM, espectrometria de massas; EM/EM, espectrometria de massas sequencial; ESI, *electrospray*; APCI, Ionização química a pressão atmosférica; CE, eletroforese capilar; DAD, detector de arranjo de diodos. FONTE: O autor (2016)

5.4. PADRÕES INTERNOS

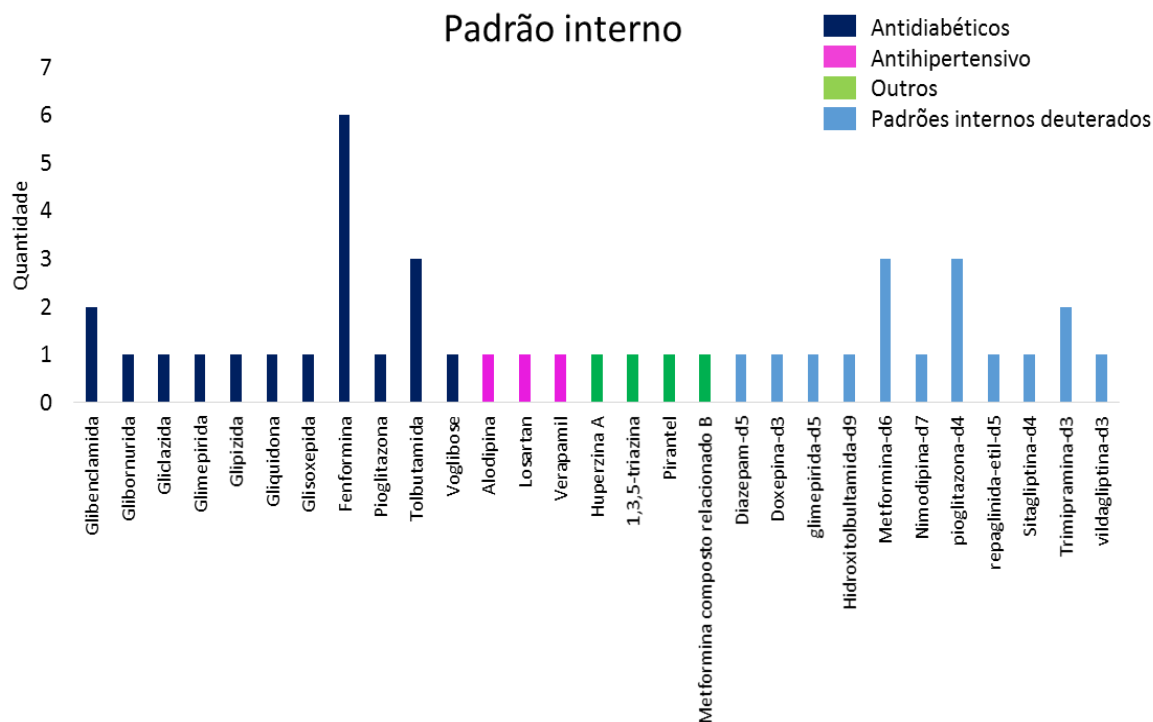
O padrão interno (PI) é uma substância química que deve ter propriedades físico-químicas similares às dos analitos e deve estar ausente na amostra. O PI é adicionado em quantidade constante em todas as amostras, com o intuito de minimizar erros aleatórios e sistemáticos causados durante o procedimento analítico, uma vez que o PI é exposto às mesmas condições experimentais que o analito durante a preparação amostral e a corrida analítica. Para métodos que utilizam espectrometria de massas, as agências regulatórias EMA e ANVISA recomendam a utilização de um isótopo estável, uma vez que as propriedades de ionização do PI e do analito devem ser semelhantes (OLIVEIRA et al., 2010).

Ao utilizar o PI na construção da curva de calibração, as concentrações do composto de interesse são relacionadas com as razões sinal de resposta do analito/sinal de resposta do PI.

Com relação aos estudos incluídos, somente quatro artigos optaram por não utilizar PI. Dos demais, 16 utilizaram outros antidiabéticos não contemplados pelo método, oito empregaram padrões deuterados, três usaram antihipertensivos e três usaram outros compostos (Gráfico 2).

Ao empregar fármacos como PI, deve-se certificar que estes não sejam utilizados pelo paciente. Se o medicamento escolhido como PI estiver na amostra antes da sua adição deliberada, a concentração final de PI na amostra será maior do que deveria, resultando em razões resposta do analito/resposta do PI incorretas, comprometendo a análise. Sendo assim, para evitar este problema e não limitar a aplicação do método a alguns pacientes, não é recomendado selecionar como PI fármacos comumente utilizados, como antidiabéticos e antihipertensivos.

GRÁFICO 2 – PADRÕES INTERNOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS INCLUÍDOS DA REVISÃO



FONTE: O autor (2016)

5.5. MÉTODOS BIONALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA HUMANO

Dentre as técnicas analíticas encontradas na literatura para quantificar as associações de antidiabéticos orais em plasma humano, 31 artigos utilizaram cromatografia líquida acoplada com diferentes detectores. Esta técnica, por ser uma importante ferramenta analítica de separação, é muito utilizada para identificar ou quantificar compostos em matrizes complexas (ricas em interferentes) como plasma e soro (TONHI et al., 2002; MALDANER et al., 2009). Outras técnicas como eletroforese capilar (CE) e cromatografia em fluido supercrítico (SFC) também foram encontradas na literatura, todavia, somente em um e dois estudos, respectivamente.

Nos 31 métodos que usaram cromatografia, 23 desenvolveram utilizando uma coluna octadecil (c18), um artigo desenvolveu com coluna octil (c8), dois usaram coluna ciano, três desenvolveram em coluna fenil e também dois usaram

cromatografia com interação hidrofílica (HILIC) com coluna sílica e sílica modificada. Embora a coluna c18 seja a fase estacionária mais utilizada em cromatografia líquida, em alguns casos pode não ser recomendada (TONHI et al., 2002). Por exemplo, em estudos envolvendo fármacos altamente polares, como a metformina. Nestes casos é preferível a utilização de colunas mais polares, como demonstrado no estudo de Georgita *et al.* (2007) e Sorensen (2012). Por outro lado, sulfonilureias apresentam média e baixa polaridade, portanto uma coluna com alta carga de carbonos é preferível (MAGNI et al., 2000; HOIZEY et al., 2005). Deste modo, para desenvolver um método simultâneo para diferentes classes de antidiabéticos, colunas de polaridade intermediária devem ser testadas.

Além disso, o modo de eluição é um importante passo no desenvolvimento do método cromatográfico. A aplicação da eluição gradiente resulta na alteração da polaridade da fase móvel durante a corrida cromatográfica. Assim, picos de analitos com diferentes polaridades que se apresentariam distantes em corridas isocráticas podem ser aproximados, culminando em uma análise curta (9 publicações). Por outro lado, 22 artigos realizaram a corrida utilizando o modo de eluição isocrática, o que pode ser justificado pela simplicidade, facilidade no desenvolvimento e transferência do método e por não requerer tempo de equilíbrio (SCHELLINGER; CARR, 2006; CABO-CALVET et al., 2014).

Com relação à temperatura de forno da coluna, 14 artigos a mantiveram em temperatura ambiente, enquanto 11 a mantiveram aquecida. Os outros seis artigos não trouxeram essa informação.

Para avaliar se os métodos apresentaram uma cromatografia satisfatória, *i.e.*, uma interação adequada com as fases estacionária e móvel, foi calculado o fator de retenção (k). O fator de retenção está associado com a taxa de eluição do analito ao longo da corrida cromatográfica, e depende dos tempo de retenção e tempo morto. O tempo de retenção representa o intervalo entre a injeção e a detecção da substância, correspondendo ao período que o analito permanece no sistema cromatográfico; o tempo morto é o intervalo entre a injeção e o primeiro distúrbio da linha de base monitorado pelo detector, ou seja, o tempo que a fase móvel leva para percorrer a coluna (NIKITAS et al., 2004; CABO-CALVET et al., 2014). Para a realização do cálculo de k , o tempo de retenção e as características das colunas foram levados em consideração, conforme as

orientações preconizadas pela USP 37 (*United States Pharmacopeia*), (USP). O fator de retenção é tido como aceitável entre o intervalo de $2 < k < 10$ (USP; FDA, 1994). Foi observado dentre os estudos incluídos na revisão que 16 apresentaram o primeiro analito da corrida cromatográfica com $k < 1$. Além disso, em quatro artigos os tempos de retenção foram muito próximos ao tempo morto, apresentando k próximo a 0. Dentre estes, um artigo apresentou três analitos com tempo de retenção inferior ao tempo morto teórico. Estes resultados demonstraram que essas substâncias apresentam pouca ou nenhuma interação com a fase estacionária. Assim, não foram cromatograficamente separadas, sendo suscetíveis à coeluição com vários interferentes (CABO-CALVET et al., 2014). Os baixos valores de k podem ser associados à escolha inadequada da coluna ou da composição/eluição da fase móvel.

Com relação aos detectores, a eletroforese capilar foi acoplada com detector de arranjo de diodos (DAD) e a cromatografia em fluido supercrítico foi combinada com espectrometria de massas. A cromatografia líquida foi acoplada com DAD ou ultravioleta (UV) em oito artigos e com espectrometria de massas em 23 artigos.

A CL-EM foi a associação de técnica analítica mais utilizada, possivelmente devido à EM mensurar a relação massa/carga dos íons, permitindo uma detecção seletiva dos compostos alvos. Além disso a EM consiste em uma técnica com alta sensibilidade, precisão e exatidão quando comparada a outras técnicas analíticas (LIM; LORD, 2002; DASS, 2007).

Para a formação de íons na fase gasosa, os espectrômetros de massas necessitam de uma fonte de ionização. As fontes de ionização compatíveis com a cromatografia líquida são a *Electrospray* e a ionização química à pressão atmosférica. Nos artigos incluídos na revisão, a ESI foi a fonte de ionização mais utilizada (21 publicações), devido a sua alta robustez, facilidade de uso e aplicabilidade para várias substâncias, incluindo macromoléculas (KORFMACHER, 2005; DASS, 2007; CHIARADIA et al., 2008). Os outros três estudos utilizaram APCI, em razão desta fonte de ionização ser recomendada para compostos apolares, ou para análises que utilizam altos volumes de fase aquosa (DASS, 2007; CHIARADIA et al., 2008; LANÇAS, 2009).

Além disso, o modo de ionização utilizado em quase todos os estudos foi o positivo, dada a relativa facilidade com que os antidiabéticos são protonados.

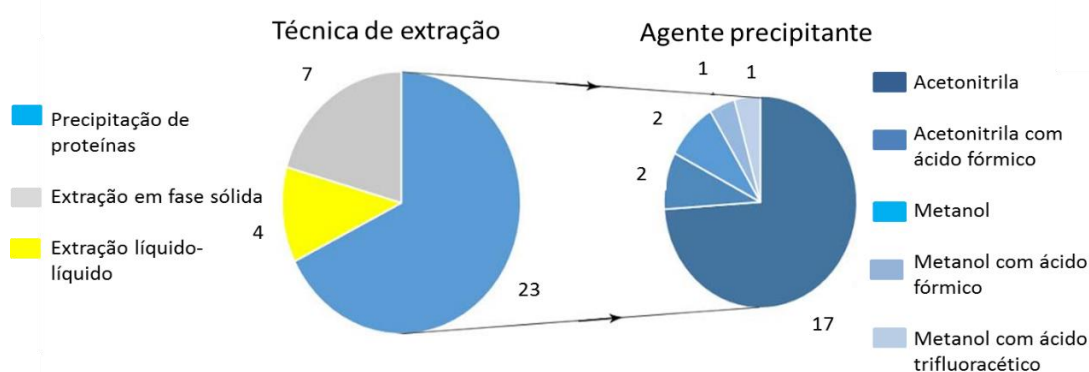
Isto ocorre, por estas substâncias apresentarem grupamentos com pares de elétrons disponíveis como aminas, amidas e ésteres. Entretanto, no estudo de Di Rago *et al.*, (2014) foi utilizado o modo negativo de ionização para a glimepirida, e no estudo de Hoizey (2005), para a clorpropamida e tolbutamida.

Em relação aos analisadores de massas utilizados, o quadrupolo foi o que mais se destacou. Foi encontrado nos estudos na forma de quadrupolo simples (3 publicações) ou triplo quadrupolo (16 publicações). O triplo quadrupolo é constituído por dois quadrupolos em série com uma cela de colisão entre eles. Esta cela de colisão permite a fragmentação dos analitos, o que aumenta a seletividade e sensibilidade dos métodos, justificando assim, porque o triplo quadrupolo é o preferido para métodos quantitativos (WATSON; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003). No entanto, foram utilizados em alguns métodos o analisador ion trap (3 publicações) e o QTOF (1 publicação), sendo este último um híbrido, que associa a sensibilidade do quadrupolo com a alta resolução do TOF.

5.6. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE

Dentre os principais processos de extração, que são a extração líquido-líquido, precipitação de proteínas e extração em fase sólida, observou-se que a técnica mais utilizada para tratamento de amostras de sangue contendo associações de antidiabéticos orais foi a precipitação de proteínas. Provavelmente por ser uma técnica simples, de baixo custo e, principalmente, por ser aplicável para a extração de compostos polares e apolares simultaneamente (HENNION, 1999; BLAHOVÁ; BRANDŠTETEROVÁ, 2004; ORLANDO *et al.*, 2009; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; WAL *et al.*, 2010). Além disso, o principal agente precipitante usado para a realização de extração por precipitação de proteínas foi acetonitrila, como demonstrado no Gráfico 3.

GRÁFICO 3 – TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E AGENTES PRECIPITANTES UTILIZADOS



FONTE: O autor (2016)

5.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICOS

Os métodos incluídos na revisão sistemática foram validados de acordo com os critérios estabelecidos pelo “*Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*” - FDA (16 publicações), “*Harmonized Tripartite Guideline*” - *International Conference on Harmonization* (3 publicações), “RDC 27/2012 - ANVISA (1 publicação), “*The Fitness for Purpose of Analytical Methods*” - Eurachem (1 publicação), “*Requirements for Initial Assay Validation and Publication in Journal of Chromatography B*” - *Journal of Chromatography B* (1 publicação), “*Requirements for the Validation of Analytical Methods*” - *Society of Toxicological and Forensic Chemistry* (1 publicação) e “*Validation of New Methods*” – por Peters, Drummer e Musshoff, 2007 (1 publicação). Os outros 10 estudos não declararam ter usado nenhum guia de validação (B, 1998; FDA, 2001, 2013; ICH, 2005; PETERS et al., 2007, 2009; BRASIL, 2012; EURACHEM, 2014)

Os parâmetros de validação bioanalíticos avaliados por esta revisão sistemática foram: limite de detecção e quantificação, seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão, recuperação, efeito matriz, efeito residual e estabilidade, levando em consideração os guias da ANVISA, FDA e EMA. Além disso, os parâmetros robustez e *system suitability* também foram discutidos, em decorrência de terem sido realizados em alguns estudos.

5.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação

Vinte e cinco métodos avaliaram o LIQ dos analitos em estudo, com base na relação 10 vezes o S/R (relação sinal-ruído), estando de acordo com os guias da FDA e EMA, que orientam que o LIQ seja no mínimo cinco vezes o S/R

O guia da EMA relata que o LIQ pode ser adaptado com base na concentração esperada e no objetivo de estudo. Ou seja, o LIQ não necessita ser tão baixo quanto poderia se essas concentrações baixas não são esperadas serem encontradas nas amostras em análise. Por exemplo, a clorpropamida é um antidiabético que apresenta concentração máxima (C_{max}) em estudos farmacocinéticos próximo a 30 µg.mL⁻¹, um valor considerado alto. Portanto, não é necessário procurar por quantidades muito baixas de clorpropamida em estudos de monitoramento terapêutico, visto que valores baixos não são esperados. Assim, nos estudos envolvendo clorpropamida observamos que em geral o LIQ é mais alto do que o LIQ dos demais analitos

Nenhum dos guias de validação de métodos bioanalíticos requer a avaliação do parâmetro limite de detecção. Mesmo assim, 19 métodos determinaram o LD considerando-o três vezes o S/R, como sugerido pelos guias analíticos da ICH e da ANVISA. Embora não seja obrigatório, a determinação deste parâmetro é interessante quando a identificação qualitativa de um analito é uma informação relevante.

5.7.2. Seletividade

Grande parte dos estudos demonstrou a seletividade do método através de imagens, comparando cromatogramas da amostra processada do LIQ com cromatograma de amostra branco. Somente três artigos apresentaram os resultados de seletividade por meio de valores percentuais, conforme sugerido pelos guias da ANVISA e da EMA (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

Dos 34 métodos incluídos na revisão, 29 relataram que o método era seletivo, sendo que 28 destes analisaram seis ou mais amostras, como orientado pelos guias. Além disso, três destes artigos incluíram amostras lipêmicas e hemolisadas, como orientado pela ANVISA.

Apesar da importância da seletividade, cinco artigos não fizeram a avaliação deste parâmetro, provavelmente pelo fato de estes estudos não terem seguido nenhum guia de validação.

Os métodos envolvendo espectrometria de massas, técnica mais utilizada dentre os artigos incluídos nesta revisão (24 publicações), são considerados mais seletivos do que métodos com detector de ultravioleta e fluorescência, por determinarem a relação massa/carga (m/z) de cada íon de interesse (KRUVE et al., 2015). Logo, substâncias que co-eluem podem ser diferenciadas devido às diferentes razões m/z (como nos artigos incluídos: Magni *et. al.* (2000), Lin *et. al.*, (2004) e Maurer *et. al.*, (2002). Esta maior seletividade é uma das principais razões porquê métodos de CL-EM podem analisar um grande número de analitos em um tempo de corrida menor. Por outro lado, substâncias que eluem no mesmo tempo podem causar supressão iônica e contribuir para o aumento do efeito matriz, o que deve ser verificado para garantir a reprodutibilidade do método.

5.7.3. Curva de Calibração

Apenas 15 métodos seguiram as instruções sobre o número de curvas. De acordo com os guias, no mínimo três curvas deveriam ser construídas. Os demais 19 métodos não relataram quantas curvas foram feitas. Em relação aos níveis de calibração, 21 métodos incluíram seis ou mais pontos, como orientado pela FDA, EMA e ANVISA. Quatro artigos construíram a curva com somente quatro ou cinco níveis e nove não trouxeram essa informação. Além disso, somente seis estudos relataram incluir amostra branco plasma normal (BPN) (amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno) e zero (BPZ) (amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno) na preparação da curva.

O intervalo da curva deve variar entre os limites inferior e superior de quantificação (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013). Todavia, no estudo de Jingar *et. al.* (2008) foi observado que o primeiro ponto da curva é inferior ao LIQ, o que pode comprometer a precisão e exatidão dos resultados.

A curva é considerada satisfatória quando o desvio for menor ou igual a 15% da concentração nominal, exceto para o LIQ, que pode variar até 20%. Estas especificações devem ser cumpridas por no mínimo 75% dos pontos (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013). Entretanto, somente oito artigos seguiram essas recomendações. Os demais artigos não relataram se este critério foi avaliado e consideraram a curva aceitável através do coeficiente de correlação (r) obtido. Na prática, se o o coeficiente de correlação for superior a 0,98, como sugerido pelo guia bioanalítico revogado da ANVISA (resolução nº899, de 29 de maio de 2003) pode se dizer que o método é linear, entretanto, não é certo que cada ponto da curva foi preciso e exato, podendo não atender os critérios propostos pela FDA, EMA e ANVISA. Trinta e dois artigos apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,98, enquanto dois apresentaram valores inferiores a 0,98.

5.7.4. Precisão

Dos 34 artigos incluídos na revisão, 20 realizaram a precisão conforme as recomendações dos guias e obtiveram valores dentro do estabelecido, enquanto que em um estudo (Tirumala *et. al.*,2008) os autores não relataram como foi determinado este parâmetro, apenas afirmaram que o método era preciso.

Os demais artigos estão em desacordo com os guias, devido aos fatos de extrapolarem o coeficiente de variação, apresentando valores de CV superiores a 20% para alguns pontos (3 publicações); realizarem este ensaio em solução (1 publicação); apresentarem somente o ensaio intracorrída, não verificando a precisão em corridas ou dias diferentes (4 publicações); executarem este parâmetro com apenas uma ou duas concentrações, embora o guia da FDA sugira o uso de três níveis, da EMA o uso de quatro níveis (CQ-LIQ, CQB, CQM e CQA) e da ANVISA, cinco níveis (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) (5 publicações); e também por não realizarem os testes em quintuplicata para cada nível de concentração (5 publicações) (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

5.7.5. Exatidão

Dentre os artigos incluídos, dois extrapolaram os valores recomendados para o erro padrão relativo (EPR), apresentando EPR superior a 20%. Desta forma, a concentração média obtida experimentalmente nestes estudos pode não corresponder à verdadeira concentração dos analitos.

Com relação às exatidões intracorrída e intercorrída, somente três artigos se mostraram em desacordo com os guias, visto não avaliarem a exatidão intercorrída. Desta forma, não verificaram se as concentrações obtidas sofrem alterações durante diferentes corridas ou dias.

Um estudo executou este ensaio somente com dois níveis de concentração, enquanto dois estudos realizaram somente com um nível. Estas publicações estão em desacordo com o recomendado pelas agências regulatórias, visto que a FDA sugere para este ensaio no mínimo três níveis de calibração, EMA recomenda quatro (CQ-LIQ, CQB, CQM e CQA) e a ANVISA cinco (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD).

Dos estudos restantes, 24 conduziram o ensaio seguindo as orientações dos guias, um não avaliou este parâmetro e em um artigo só foi mencionado que o método era exato, sem relatar como foi feito o procedimento e quais resultados foram obtidos.

5.7.6. Recuperação

Após a análise dos 34 artigos, observou-se que 29 avaliaram a recuperação do método de preparação amostral. Dentre estes, 13 conduziram este parâmetro comparando amostras fortificadas antes da extração (FA) com amostras em solução, como orientado pela FDA. Outros 13 artigos compararam amostras FA com amostras fortificadas depois da extração (FD), o que pode ser uma alternativa à orientação da FDA e é recomendado pelo guia do Japão “*Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development*” (2003) (MHLW, 2013). Os outros três estudos não relataram como realizaram este procedimento. Os valores de recuperação de cada método, assim como a preparação da amostra são apresentados na Tabela 2.

Ainda, somente 19 relataram os desvios obtidos para a recuperação dos analitos. Destes, dois artigos apresentaram desvio superior a 15%, em desacordo com o preconizado pela FDA, única agência regulatória que discorre sobre a avaliação deste parâmetro. Portanto, a recuperação destes dois métodos não pode ser considerada precisa e reprodutível de acordo com a FDA.

TABELA 2 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E RECUPERAÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

Artigo	Método para avaliar a recuperação	Preparação da amostra	Recuperação (%)
ATTIMARAD et al., 2015	FA x FD	PP com acetonitrila	Metformina 95.4 Miglitol: 94.9
BEN-HANDER et al., 2015	Não testou este parâmetro	PP com acetonitrila e microextração em fase líquida	Não testou este parâmetro
REDDY et al., 2015	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Metformina: 89-94 Sitagliptina: 100-107
SHANTIKUMAR et al., 2015	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Linagliptina: 91,67 Saxagliptina: 94,32 Sitagliptina: 95,37 Teneligliptina: 93,29 Vildagliptina: 96,82
NI et al., 2014	FA x fortificado em solução	LL com etil acetato	Glimipirida: 77,11-78,53 Pioglitazona: 83,41-88,51
PONTAROLO et al., 2014	FA x FD	PP com acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico	Metformina: 89,2-93,0 Vildagliptina: 103,2-107,3
RAGO et al., 2014	Não testou este parâmetro	PP com acetonitrila	Não testou este parâmetro
RASHID et al., 2014	FA x fortificado em solução	PP com metanol e ácido tricloroacético	Glibenclamida: 98,19-98,56 Metformina: 98,51-99,26
VIANA et al., 2014	FA x FD	Microextração em sorvente empacotado	Clorpropamida: 37,2-46,7 Glimepirida: 49,3-71,9 Glipizida: 50,2-59,4
JAGADEESH et al., 2013	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Hidroxiopiolitazona: 71,35-74,76 Metformina: 84,22-85,97 Pioglitazona: 74,05-81,10
LI et al., 2013	FA x FD	PP com methanol	Glipizida: 83,5-94,9 Metformina: 78,9-85,3
BINZ et al., 2012	FA x FD	PP com acetonitrila	Glibenclamida: 61,6 Gliclazida: 56,4 Glipizida: 67,6 Gliquidona: 61,0 Metformina: 61,7
HEFNAWY et al., 2012	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Glimepirida: 97,2-100,6 Rosiglitazona: 98,7-101,9
SØRENSEN, 2012	FA x fortificado em solução	EFS com cartuchp Oasis weak cation-exchange (60 mg)	Buformina: 93 Metformina: 91 Fenformina: 89
CHEN et al., 2011	FA x FD	PP com acetonitrila	Metformina: 87,0-93,6 Rosiglitazona: 80,5-92,0

(CONTINUAÇÃO) TABELA 2 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E RECUPERAÇÃO DOS ARTIGOS INCLUIDOS

Artigo	Método para avaliar a recuperação	Preparação da amostra	Recuperação (%)
GONZALEZ et al., 2011	FA x FD	PP com metanol e sulfato de zinco	Carbutamida: 66,6 Glibenclamida: 62,0 Glibornurida: 63,6 Gliclazida: 39,0 Glipizida: 74,5 Gliquidona: 48,2 Metformina: 65,1 Repaglinida: 58,7 Rosiglitazona: 57,5 Tolazamida: 47,3 Tolbutamida: 65,8
HESS et al., 2011	FA x FD	LL com terc-butil metil éter	Glibenclamida: 84,02-101,4 Glibornurida: 95,60-98,58 Gliclazida: 79,68-88,44 Glimepirida: 85,05-99,57 Glipizida: 79,32-102,4 Gliquidona: 89,63-90,59 Glisoxepida: 90,10-101,4 Nateglinida: 89,89-97,92 Pioglitazona: 90,55-103,8 Repaglinida: 99,98-102,8 Rosiglitazona: 91,26-105,7 Saxagliptina: 37,20-39,20 Sitagliptina: 79,90-85,25 Vildagliptina: 40,62-41,87
AGRAWAL et al., 2010	Não relatado	PP com acetonitrila	Gliclazida: 93-96 Metformina: 95-102
MAIER et al., 2009	Não testou este parâmetro	PP com acetonitrila	Não testou este parâmetro
RANETTI et al., 2009	Não testou este parâmetro	PP com acetonitrila	Não testou este parâmetro
SENGUPTA et al., 2009	FA x FD	LL com diclorometano: isoamilalcool, 9:1, v/v	Metformina: >91 Glimepirida: >91 Pioglitazona: >91
TIRUMALA; LAKSHMI, 2009	Não testou este parâmetro	PP com metanol e 0.05% de ácido fórmico	Não testou este parâmetro
JINGAR et al., 2008	FA x fortificado em solução	LL com clorofórmio	Glimepirida: 65,7-74,3 Rosiglitazona: 65,2-70,5
DING et al., 2007	FA x FD	PP com acetonitrila	Glibenclamida: 91-105 Gliclazida: 80-93 Glimepirida: 102-106 Glipizida: 95-105 Metformina: 74-94 Rosiglitazona: 98-123 Sitagliptina: 95-116
GEORGITA et al., 2007	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Glibenclamida: 73,4 Metformina: 56,0
MISTRI et al., 2007	FA x FD	PP com acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico	Glibenclamida: 71,2 Metformina: 69,3

(CONCLUSÃO) TABELA 2 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E RECUPERAÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

Artigo	Método para avaliar a recuperação	Preparação da amostra	Recuperação (%)
YARDIMCI et al., 2007	FA x fortificado em solução	PP com acetonitrila	Metformina: 91,48-97,62 Rosiglitazona: 91,48-97,62
ZHANG et al., 2007	FA x FD	PP com acetonitrila	Metformina: 77,9-87,4 Rosiglitazona: 80,2-83,6
ABURUZ et al., 2005	Não relatado	EFS com cartucho OASIS® HLB (1cc, 30 mg)	Glibenclamida: 81,8-87,3 Glimepirida: 94,7-101,9 Metformina: 76,3-89,7 Gliclazida: 87,6- 97,7 Glipizida: 79,7- 90,4 Metformina: 87,8- 97,1
HOIZEY et al., 2005	FA x fortificado em solução	LL com dietil éter	Carbutamida: 81,5-107,2 Clorpropamida: 97,0-118,2 Glibenclamida: 95,1-101,9 Glibornurida: 83,0-98,4 Gliclazida: 102,2-110,9 Glimepirida: 92,9-109,9 Glipizida: 94,3-110,4 Tolbutamida: 92,9-98,7
ZHONG et al., 2005	FA x FD	PP com acetonitrila	Gliclazida: 88,1-104,0 Metformina: 71,0-83,6
LIN et al., 2004	FA x fortificado em solução	LL com metil-t-butil eter/ cloreto n-butil	Glipizida: 85,2-86,7 Rosiglitazona: 84,3-93,5
MAURER et al., 2002	FA x fortificado em solução	LL com dietil eter- etil acetato	Glibenclamida: 79,0-100,1 Glibornurida: 68,0-82,4 Gliclazida: 67,8-69,2 Glimepirida: 76,2-76,4 Glipizida: 72,3-74,1 Gliquidona: 82,6-96,4 Glisoxepida: 65,9-71,4 Tolazamida: 76,6-79,1 Tolbutamida: 72,0-83,4
MAGNI et al., 2000	Não relatado	EFS com cartucho ENVI-18	Clorpropamida: 94,8 Glibenclamida: 88,6 Glipizida: 90,0

NOTA: FA, fortificado antes do processo de extração; FD, fortificado depois do processo de extração; EFS, extração em fase sólida, PP, precipitação de proteínas; LL, extração líquido-líquido.

FONTE: O autor (2016)

5.7.7. Efeito Matriz

O efeito matriz está associado à influência que outros compostos presentes na matriz provocam na quantificação dos analitos. Diferentes matrizes apresentam diferentes componentes, podendo estes comprometer a resposta do analito, levando à supressão ou aumento de sinal iônico, alteração no tempo de retenção, à formação de cauda (*tailing*) e à alteração da linha de base. Este

fenômeno acontece principalmente em matrizes complexas como o plasma. Deste modo, um método não pode ser desenvolvido e validado em solução e depois aplicado a uma matriz diferente, como plasma ou soro. Por essa razão, 13 artigos foram excluídos da revisão, visto que estes métodos foram desenvolvidos e validados em solução (matriz com poucos interferentes) e somente após aplicados em plasma (matriz rica em compostos complexos), gerando assim resultados não confiáveis.

Como exemplo deste problema, em um dos artigos incluídos (Magni *et al.* (2000), o autor relatou ter preparado duas curvas diferentes de calibração, uma em solução e outra em plasma. Diante disso, os autores observaram que a inclinação da curva para o analito clorpropamida em solução era o dobro do obtido em amostra biológica, resultado que evidencia o efeito matriz.

O fenômeno de efeito matriz está associado principalmente à fonte de ionização ESI, pois, em amostras mais complexas, há uma saturação no processo de ionização e dessolvatação dos analitos da fase líquida para íons na fase gasosa além de haver teorias justificando que o aumento da viscosidade da amostra tende a reduzir a evaporação do solvente nessa fonte de ionização (SOUVERAIN *et al.*, 2004; EECKHAUT, VAN *et al.*, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Contudo, ao usar fonte de ionização APCI, o efeito matriz é bem mais reduzido pois os analitos já se encontram previamente à introdução na fonte de ionização na fase gasosa, não passando assim pela etapa de formação de gotículas ou dessolvatação (SOUVERAIN *et al.*, 2004; EECKHAUT, VAN *et al.*, 2009). Dos 24 métodos incluídos na revisão que utilizaram EM, somente quatro não fizeram o ensaio de efeito matriz, mas dois destes usaram fonte de ionização APCI.

Embora o guia da FDA não instrua sobre este parâmetro, os guias da ANVISA e da EMA estabelecem que o efeito matriz deve ser avaliado em métodos envolvendo espectrometria de massas.

Três artigos não avaliaram o efeito matriz da forma preconizada pela EMA e ANVISA, pois estes compararam as respostas de amostras FA com as respostas em solução. Se o analito é adicionado anteriormente ao processo de extração, a eficiência da extração será considerada na avaliação deste parâmetro, mascarando o real efeito matriz e dando a impressão de um efeito matriz maior. Inclusive, o procedimento que estes autores utilizaram para

calcular o efeito matriz consiste na definição de como o ensaio de recuperação deve ser realizado.

Com relação ao desvio do fator matriz normalizado (FMN), cálculo realizado para avaliar o efeito matriz, observou-se que três métodos apresentaram valores acima do recomendado. González *et al.* (2011) e Di Rago *et al.* (2014) desenvolveram métodos quantitativos para vários fármacos, não limitando-se apenas a antidiabéticos. Foram 55 e 132 medicamentos analisados em cada método, respectivamente. Quando um número tão alto de analitos é quantificado em um único método, torna-se difícil escapar do efeito matriz. Apesar dos esforços dos autores para reduzir o efeito matriz, nem todos os analitos apresentaram bons resultados. Já no artigo de Binz *et al.* (2012), o método foi desenvolvido para apenas cinco antidiabéticos. Porém, foram obtidos valores expressivos de efeito matriz, com até 56% de variação. Embora este valor tenha sido apresentado no artigo, o autor não comentou nada sobre. Mas, como o estudo foi conduzido sem seguir nenhuma diretriz para a validação, pode ser que os autores não estivessem cientes das variações máximas recomendadas, mostrando a importância de seguir um guia apropriado para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos.

5.7.8. Efeito Residual

O guia de validação da FDA somente recomenda que este parâmetro deva ser monitorado, todavia, os guias da ANVISA e da EMA sugerem e estabelecem o modo da sua realização.

Apenas seis artigos realizaram este ensaio, apesar de sua importância, uma vez que avalia se há contaminação na corrida analítica decorrente de análises anteriores, o que pode influenciar os resultados de outros parâmetros como a curva de calibração, precisão e exatidão. Dentre os artigos que realizaram a avaliação do efeito residual, todos provaram não sofrer efeito residual de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA e pela EMA (EMA, 2011; BRASIL, 2012).

5.7.9. Estabilidade

Este ensaio tem como objetivo simular e reproduzir as condições a que as amostras são submetidas durante todo processo de validação. Para isso, os seguintes testes devem ser realizados: estabilidade dos analitos e padrões internos (Pis) em matriz, estabilidade dos analitos e Pis em solução estoque e estabilidade dos analitos e Pis em solução trabalho (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; HANSEN; BJERGAARD, 2015).

Entre os artigos incluídos nessa revisão sistemática, observou-se que 12 métodos não conduziram o ensaio de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, 11 não testaram estabilidade de curta duração, 13 não avaliaram a estabilidade a longo prazo e 20 não executaram a estabilidade de amostra processada. Além disso, 26 artigos não testaram a estabilidade em solução. Ao não avaliar a estabilidade das amostras, pode haver a subestimação ou a superestimação da concentração dos analitos, principalmente em amostras biológicas, nas quais a instabilidade é recorrente devido aos diversos interferentes coexistentes.

5.7.10. Robustez

Apesar de este parâmetro não constar nos principais guias bioanalíticos, três artigos incluíram este ensaio na validação do método. Este parâmetro é opcional no processo de validação analítica e avalia a capacidade do método em resistir a pequenas variações. Pode ser encontrado em guias analíticos como o da ANVISA “Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003” e da ICH “*Validation of analytical procedures*” (2005) (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Sendo assim, neste ensaio pequenas modificações, como alterações no pH ou na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel, são realizadas em métodos cromatográficos. Quando um analisador de massas também é utilizado, alterações na temperatura do gás de secagem, pressão do gás nebulizador e configurações da fonte de ionização são algumas das condições analíticas que podem ser variadas (KRUIVE et al., 2015).

Dentre os três artigos que realizaram este ensaio, Rashid *et al.* (2014) utilizaram diferentes sistemas cromatográficos, Tirumala *et al.* (2009) avaliaram modificações na composição e no fluxo da fase móvel, assim como Yardimci *et al.* (2007), que também modificaram a concentração e o pH do tampão. Todos estes ensaios foram expressos pelo coeficiente de variação e todos relataram terem sido robustos.

Apesar da avaliação da robustez não ser requerida pelo guias bioanalíticos (EMA, FDA e ANVISA), estes abordam que quando pequenas modificações forem feitas no método, uma validação parcial deve ser realizada. Isto pode ser entendido como uma maneira de avaliar a performance do método quando pequenas modificações deliberadas forem cometidas.

5.7.11. *System suitability*

Este ensaio é somente proposto pelo guia da FDA. *System suitability* é definido como um conjunto de testes que objetivam avaliar a adequação do sistema, para que os resultados gerados possam ser considerados confiáveis (FDA, 2013). Porém, este parâmetro não é classificado como fundamental para a validação, e por isso não é normalmente avaliado.

O guia da FDA não aborda quais testes devem ser realizados para avaliar a conformidade do sistema. Este parâmetro é melhor abordado pela USP 37 que recomenda avaliar o fator de capacidade (k), eficiência cromatográfica (N), simetria do pico (T) e resolução (R). Um artigo (Yardimci 2007) dentre os incluídos nesta revisão sistemática avaliou a adequação do sistema, através do fator de capacidade e da simetria dos picos (USP).

6. CONCLUSÃO

Nos últimos anos vários métodos tem sido desenvolvidos para o monitoramento terapêutico de associações de antidiabéticos em plasma/ sangue humano. A partir da revisão sistemática foi possível reunir e sistematizar essas informações da literatura, que servem como subsídio para guiar o desenvolvimento de futuros métodos bioanalíticos para determinação de antidiabéticos em amostras biológicas.

Ao extrair os dados da literatura, observou-se que, devido à dificuldade em criar métodos envolvendo vários analitos, grande parte contemplou somente poucas classes terapêuticas e, em geral, somente dois analitos. Com relação à preparação das amostras e às técnicas analíticas, destacaram-se a precipitação de proteínas e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, respectivamente.

Além disso, os resultados obtidos na revisão sistemática associados à validação dos métodos demonstraram que grande parte dos estudos apresentaram falhas com relação à execução dos parâmetros de validação. Essa inconsistência é possivelmente relacionada a escolha dos guias, visto que alguns autores seguiram guias analíticos e outros não seguiram nenhum guia. Ainda, apesar de grande parte dos métodos incluídos seguirem guias bioanalíticos apropriados, em muitos casos os autores interpretaram incorretamente as recomendações de execução. Este problema na execução do parâmetro pode estar vinculado ao fato de muitos guias abordarem alguns parâmetros de forma abrangente, possibilitando assim, com que os pesquisadores executem da sua forma.

De maneira geral os principais problemas de validação foram: não realização do parâmetro ou ausência de descrição de como o parâmetro foi realizado, extrapolação do valor máximo permitido para o desvio aceitável, número de amostragem inadequada e não realização de ensaios interdias.

A execução inapropriada destes ensaios analíticos pode desencadear resultados discrepantes entre a concentração teórica/real e prática, gerando assim, um alto número de resultados não confiáveis e comprometendo a credibilidade do método para a aplicação pretendida. Diante disso, foram evidenciados a falta de padronização dos ensaios de validação.

CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

7. INTRODUÇÃO

Diversos métodos bioanalíticos são descritos na literatura para a determinação de associações de antidiabéticos em matrizes biológicas. A maioria desses procedimentos se baseia principalmente na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial. Contudo, com o avanço tecnológico, novas alternativas vem sendo associadas à análises bioanalíticas. A cromatografia líquida de ultra eficiência é o avanço mais recente das técnicas de separação, sendo compatível com fases estacionárias com partículas menores que 2 μm . A redução do tamanho das partículas e da coluna aumentam a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises. Além disso, CLUE pode ser associada a detectores como a espectrometria de massas.

Com relação a espectrometria de massas, analisadores híbridos, tais como o quadrupolo-tempo de vóo, representam novas estratégias para análises quantitativas biológicas, por permitirem associar vantagens de analisadores distintos.

Neste sentido, considerando as vantagens desses avanços tecnológicos na cromatografia e na espectrometria de massas e sabendo da importância de métodos para monitorar associações de antidiabéticos em plasma humano, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método por CLUE-EM para quantificar clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, nateglinida, pioglitazona, rosiglitazona e vildagliptina em plasma humano.

7.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico utilizando a técnica CLUE-EM para quantificação simultânea dos fármacos clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, nateglinida, pioglitazona, rosiglitazona e vildagliptina em plasma humano.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas para a quantificação simultânea dos antidiabéticos orais clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, nateglinida, pioglitazona, rosiglitazona e vildagliptina, otimizando os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas.
- Definir o método de extração da amostra (plasma humano).
- Validar o método desenvolvido para amostras de plasma humano, atendendo às normas vigentes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e normas internacionais, *Food and Drug Administration* e *European Medicines Agency*.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1. PADRÕES ANALÍTICOS

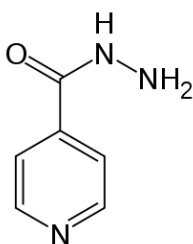
Os padrões analíticos são apresentados na Tabela 3, juntamente com a descrição do seu peso molecular, teor, marca e lote. Como padrões internos foram selecionadas a isoniazida e a sulfaquinoxalina. As estruturas químicas dos PIs estão representadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

TABELA 3 – RELAÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Analito	Peso Molecular (g.mol ⁻¹)	Teor (%)	Marca	Lote
Cloridrato de Metformina	129,164	99,7	USP	10H236
Clorpropamida	276,741	99,9	Fiocruz/ INCQS	1019
Glibenclamida	494,004	99,0	USP	G1C347
Gliclazida	323,411	100,0	Fiocruz/ INCQS	1057
Glimepirida	490,616	99,4	USP	F1H150
Isoniazida	137,139	99,5	Fiocruz/ INCQS	1067
Nateglinida	317,423	98,0	Sigma-Aldrich	018K4701V
Pioglitazona	356,439	98,0	Sigma-Aldrich	024M4747V
Rosiglitazona	357,428	98,0	Sigma-Aldrich	063M4711V
Sulfaquinoxalina	300,366	96,0	Sigma-Aldrich	SZB8158XV
Vildagliptina	303,399	98,0	Ontario Chemicals	110423CY

FONTE: O autor (2016)

FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE ISONIAZIDA.

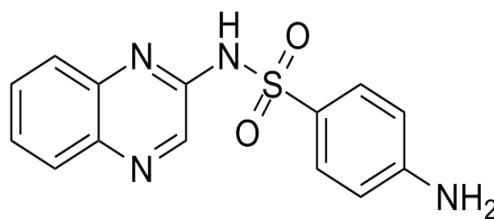


ISONIAZIDA

Metilguanida

FONTE: O autor (2016)

FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE SULFAQUINOXALINA



SULFAQUINOXALINA

4-amino-N-(quinoxalin-2-yl)benzene-1-sulfonamide

FONTE: O autor (2016)

8.2. SOLVENTES E REAGENTES

Para o desenvolvimento e validação do método foram utilizados os seguintes solventes: acetonitrila, da Panreac (Barcelona, Espanha); ácido fórmico, da J.T. Baker (New Jersey, EUA); água ultrapura, obtida por meio do sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA); formiato de amônio (97%), da Spectrum Chemical (Gardena, EUA); e metanol, da Panreac (Barcelona, Espanha).

8.3. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO

Os plasmas brancos normais, lipêmicos e hemolisados utilizados no desenvolvimento e validação do método foram obtidos na forma de bolsas, através de doação pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil).

8.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLUE-EM

8.4.1. Preparo das soluções estoque

Para o preparo das soluções estoque dos analitos e dos PIs, as substâncias químicas de referência (SQR) foram pesadas em balança analítica. Em seguida, foram dissolvidas em acetonitrila:metanol, 80:20, v/v em concordância com os dados de solubilidade fornecidos pela Farmacopeia Brasileira, 2010.

Todos as soluções estoque foram preparadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e armazenadas em *freezer* a -40°C.

8.4.2. Preparação das soluções de trabalho

Para a preparação das soluções de trabalho dos analitos e dos PIs, foi utilizado como diluente acetonitrila:água, 70:30, v/v. Foram preparadas para cada SQR soluções de trabalho nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ e 1 µg.mL⁻¹.

8.4.3. Otimização dos parâmetros espectrométricos

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado o espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA) com fonte de ionização por *electrospray*. O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás do cone e de dessolvatação foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza >99,998% da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil).

A primeira etapa realizada foi a otimização dos parâmetros espectrométricos. Foram preparadas soluções de trabalho com os aditivos ácido

fórmico e formiato de amônio no intervalo de 0,1 a 0,5% e 0,5 a 1,0 mmol.L⁻¹ respectivamente, associados e separados. As soluções foram introduzidas nos espectrômetro por infusão direta, em fluxo de 10 µL.min⁻¹, a fim de checar e melhorar os sinais dos analitos no modo de ionização positivo.

A partir disso, foi feita a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, sendo estes: voltagem do capilar e do cone, *source offset*, temperatura da fonte de ionização e de dessolvatação, fluxo do gás do cone e do gás de dessolvatação. No decorrer da corrida analítica, as massas adquiridas foram corrigidas por meio do *Lockspray*, composto por leucina encefalina na concentração de 1000 ng.mL⁻¹ e com fluxo de 20 µL.min⁻¹.

Durante todo o desenvolvimento e validação do método foi realizada diariamente a checagem da calibração, utilizando como calibrante formiato de sódio 0,05 mmol.L⁻¹ produzido a partir de hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os dados obtidos foram processados por meio dos *softwares* MassLynx V 4.1 e Quanlynx da Waters Corporation (Milford, EUA) e foram adquiridos no modo centroide em MSe.

8.4.4. Otimização dos parâmetros cromatográficos

A segunda etapa foi a otimização dos parâmetro cromatográficos. Para isso, foi utilizado um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas. Para a separação dos analitos foram testadas diferentes colunas: C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Acquity UPLC® HSS Cyano (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) e C₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm).

Para definir a composição da fase móvel, foram avaliadas diferentes combinações de acetonitrila e água, em diferentes proporções. Essas fases móveis foram testadas com os aditivos ácido fórmico e formiato de amônio, variando suas concentrações. Os modos de eluição isocrático e gradiente foram experimentados, com fluxo variando de 450 µL.min⁻¹ a 600 µL.min⁻¹.

O volume de injeção foi avaliado entre 3 a 10 µL e a temperatura da coluna foi testada a 30, 40 e 50°C.

A seleção desses parâmetros foi baseada no melhor resultado do perfil cromatográfico, sendo testadas com soluções de trabalho contendo uma mistura dos analitos nas concentrações de 150 ng.mL⁻¹.

8.5. TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO

Para a condução dos ensaios, foram preparadas duas soluções de trabalho: uma com todos os padrões dos analitos e outra solução contendo apenas os PIs.

Alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 50 µL da mistura de padrões e com 50 µL da mistura de PIs, e foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto. Foram testados quatro agentes precipitantes: acetonitrila, acetonitrila com 1,0% de ácido fórmico, metanol e metanol com 1,0% ácido fórmico.

Foram adicionados 700 µL desses agentes precipitantes nas amostras, sendo estas novamente agitadas em vórtex por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos, a 14.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C. Após, 500 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um vial e diluídos com água na proporção de 1:2 v/v e então centrifugados a 4.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e finalmente injetados no sistema CLUE-EM para avaliação dos resultados. Cada agente precipitante foi testado em quintuplicata e a eficiência dos solventes extratores foi obtida com base na comparação entre as áreas dos picos cromatográficos resultantes de cada procedimento.

8.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas as condições de extração dos analitos e dos PIs da matriz, foi definido o procedimento de preparação de amostras para o

desenvolvimento e validação do método. Assim, alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram fortificadas com 50 µL de soluções de trabalho com mistura dos analitos e 50 µL de solução de trabalho dos PIs, obtendo concentração analítica final para os PIs de 75 µg.mL⁻¹ para sulfaquinoxalina e 200 µg.mL⁻¹ para isoniazida. As amostras foram agitadas em vórtex por um minuto. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de extração, quando foram adicionados 700 µL de acetonitrila com 1% de ácido fórmico e as amostras foram novamente agitadas em vórtex por três minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 minutos a 4° C. Com isso, 500 µL do sobrenadante foram separados e diluídos na proporção 1:2 com água, v/v, de modo a obter uma solução final de 50:50 de solvente orgânico (acetonitrila com 1% de ácido fórmico):água, v/v. As amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm, 4°C por 10 minutos, para assim serem injetadas no sistema CLUE-EM.

8.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Após definição do método de CLUE-EM, foi realizada a validação bioanalítica seguindo os critérios estabelecidos pela resolução RDC 27/2012 da ANVISA, pelo guia para validação de ensaios bioanalíticos da FDA de 2013 e pelo guia da EMA de 2011 (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

Esses guias estabelecem que durante a validação devem ser avaliados os seguintes parâmetros: limite inferior de quantificação, seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão, recuperação efeito matriz, efeito residual e estabilidade (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013). Além desses, foi avaliado o limite de detecção com base na RDC n° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

8.7.1. Limite de detecção e limite inferior de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados por meio da relação sinal/ruído. Para isso, foram preparadas amostras, em triplicata, de

plasma fortificado em concentrações decrescentes dos analitos. Estas amostras foram injetadas no sistema CLUE-EM até que o menor nível detectável com precisão (desvio padrão relativo inferior a 20%) fosse atingido. O LD foi estimado através da relação S/R 3/1, enquanto que o LIQ foi baseado na concentração que produzisse S/R superior a 5/1 e também no valor esperado para o estudo (EMA, 2011; FDA, 2013).

8.7.2. Seletividade

Este parâmetro foi testado por meio do método de comparação de matriz. Para isso, foram utilizadas seis amostras de plasma branco (isentas dos compostos de estudo) de fontes distintas, sendo quatro plasmas normais, um lipêmico e um hemolisado. Essas amostras foram comparadas com uma matriz de plasma fortificada com PIs e analitos nas concentrações correspondentes aos LIQs.

Para a preparação das matrizes isentas dos analitos, foram adicionados 100 µL da solução acetonitrila:água (70:30, v/v) a alíquotas de 200 µL de plasma branco contidas em tubos plásticos de 2 mL. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e seu conteúdo submetido ao procedimento de extração, conforme descrito no item 8.6. Por último, as amostras extraídas foram transferidas para viais e injetadas no sistema CLUE-EM.

Para a preparação de matriz de plasma fortificada, foram adicionados 50 µL da solução de trabalho dos padrões nas concentrações do LIQ e 50 µL da solução dos PIs a uma alíquota de 200 µL de plasma branco contida em um tubo plástico de 2 mL. O tubo foi agitado em vórtex e, em seguida, seu conteúdo foi submetido ao procedimento de extração (tópico 8.6). Finalmente, a amostra extraída foi injetada no sistema CLUE-EM.

Para comparação dos resultados, os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos foram extraídos com a massa do composto de interesse e sobrepostos ao cromatograma extraída amostra fortificada. Diante disso, foi calculado se as respostas de picos interferentes oriundos da matriz isenta de analitos eram inferiores a 20% da área obtida no LIQ dos analitos e 5%

da área dos Pls presentes na matriz fortificada (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

8.7.3. Curva de calibração

A curva de calibração foi feita com base no método de padronização interna. Foram construídas curvas em triplicata, durante três dias consecutivos, incluindo a análise das amostras BPN e BPZ. Para a elaboração da curva, foram preparados oito níveis de concentrações dos analitos, a partir de diluições sucessivas das soluções de trabalho para a nateglinida (NAT), pioglitazona (PIO) e rosiglitazona (ROSI); e nove níveis de concentrações para clorpropamida (CLOR), glibenclamida (GBC), gliclazida (GCZ), glimepirida (GMP), metformina (MET) e vildagliptina (VDP). As concentrações dos fármacos em cada nível de calibração são demonstradas na Tabela 4.

Importante destacar que em função da diluição esse intervalo da curva para as concentrações dos analitos em plasma é dez vezes superior às concentrações analíticas.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO

NÍVEIS	CLOR ng.mL ^{-1*}	GBC ng.mL ^{-1*}	GCZ ng.mL ^{-1*}	GMP ng.mL ^{-1*}	MET ng.mL ^{-1*}	NAT ng.mL ^{-1*}	PIO ng.mL ^{-1*}	ROSI ng.mL ^{-1*}	VDP ng.mL ^{-1*}
1	50	12,5	50	12,5	25	50	25	12,5	12,5
2	100	25	125	25	50	100	50	25	25
3	150	50	250	50	100	150	70	37,5	50
4	200	75	375	75	150	200	100	50	75
5	250	100	500	100	200	250	125	62,5	100
6	300	125	625	125	250	300	150	75	125
7	350	150	750	150	300	350	175	87,5	150
8	400	175	875	175	350	400	200	100	175
9	450	200	100	200	400	-	-	-	200

NOTA: CLOR, clorpropamida; GBC, glibenclamida; GCZ, gliclazida; GMP, glimepirida; MET, metformina; NAT, nateglinida; PIO, pioglitazona; ROSI, rosiglitazona; VDP, vildagliptina. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FONTE: O autor (2016)

Além disso, foram preparados 5 mL de uma solução de trabalho de PIs, sulfaquinoxalina e isoniazida, com concentrações analíticas de 75 ng.mL^{-1} e de 200 ng.mL^{-1} , respectivamente.

Para cada analito, uma curva de calibração foi produzida com o intuito de verificar se havia relação linear entre as áreas dos picos do analito corrigidas pela área do pico do PI *versus* as concentrações dos analitos corrigidas pela concentração do PI. A construção das curvas foi feita através do modelo matemático método dos mínimos quadrados, utilizando a regressão linear $1/x$. O ângulo, a equação da reta, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados.

Os níveis da curva são considerados aprovados quando o desvio é menor ou igual a 20% para a concentração nominal do LIQ e menor ou igual a 15% para os outros níveis da curva calibração. A curva só deve ser aprovada quando no mínimo 75% dos padrões de calibração atenderem a essas especificações (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

8.7.4. Amostras de controle de qualidade

Para validar e monitorar o desempenho do método bioanalítico, amostras de controle de qualidade CQ-LIQ, assim como amostras CQB, CQM e CQA foram preparadas de maneira igual às amostras da curva de calibração. Foram feitas cinco réplicas de cada CQ com as concentrações descritas na Tabela 5.

As amostras de CQD também foram preparadas em quintuplicata, definidas como 10 vezes o ponto intermediário da curva (CQM) e de modo a obter concentrações que ultrapassassem o LSQ. Alíquotas de plasma branco ($200 \mu\text{L}$) foram fortificadas com $50 \mu\text{L}$ da solução de trabalho dos analitos e agitadas por um minuto. Em seguida, foi realizada diluição 1:10 com plasma branco e as amostras foram novamente submetidas à agitação por três minutos. Dessa mistura foram retiradas alíquotas de $200 \mu\text{L}$, às quais foram adicionados $50 \mu\text{L}$ do mix do padrão interno e $50 \mu\text{L}$ de diluente, e então extraídas e processadas conforme descrito no tópico 8.6. Por fim, as amostras foram injetadas no sistema CLUE-EM.

Para as amostras de CQ, o critério de aprovação é que no mínimo 67% de todos os CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração devem apresentar um desvio que não ultrapasse 15% em relação aos seus valores nominais (EMA, 2011; BRASIL, 2012; FDA, 2013).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Analitos	CQ-LIQ (ng.mL⁻¹)*	CQB (ng.mL⁻¹)*	CQM (ng.mL⁻¹)*	CQA (ng.mL⁻¹)*	CQD (ng.mL⁻¹)*
Clorpropamida	50	100	250	350	2500
Glibenclamida	12,5	25	100	150	1000
Gliclazida	5	12,5	50	75	500
Glimepirida	12,5	25	100	150	1000
Metformina	25	50	200	300	2000
Nateglinida	50	100	200	300	2000
Pioglitazona	25	50	100	150	100
Rosiglitazona	12,5	25	50	75	500
Vildagliptina	12,5	25	100	150	1000

NOTA: CQ-LIQ, amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD, amostra de controle de qualidade de diluição. . *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FONTE: O autor (2016)

8.7.5. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas em três dias consecutivos, em duas abordagens: intracorrída e intercorrída. Para isso, foram preparadas em cada corrida cinco réplicas das concentrações de controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), de acordo com o demonstrado na Tabela 5.

Para avaliar os parâmetros de precisão e exatidão, foram realizados os cálculos do coeficiente de variação (Equação 1) e erro padrão relativo (Equação 2), respectivamente. Ambos os valores não devem ultrapassar o valor de 15%, com exceção do CQ-LIQ, que pode atingir valores até 20% (BRASIL, 2012).

EQUAÇÃO 1

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração Média Experimental}}$$

EQUAÇÃO 2

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor Nominal}}$$

8.7.6. Recuperação

Este ensaio foi realizado com base na comparação de amostras de matriz de plasma fortificadas com os analitos e PIs antes da extração (FA) com amostras dos analitos e PIs em solução, que representam 100% de recuperação. Essa comparação foi realizada para verificar a porcentagem perdida dos analitos durante o processo de preparação amostral.

Foram preparadas três concentrações em cinco replicatas de cada tipo de amostra (FA e em solução).

As amostras em solução foram preparadas por meio da diluição da solução estoque dos analitos e PIs com o diluente acetonitrila:água, 50:50, v/v, até obter a concentração de CQB, CQM e CQA de todos os compostos (Tabela 5).

As amostras FA foram preparadas de acordo com o item 8.6. A concentração final dos analitos e PIs nessas amostras foram as concentrações de CQB, CQM e CQA descritas na Tabela 5.

8.7.7. Efeito Matriz

Para verificar a presença do efeito matriz, foram preparadas oito réplicas em solução nas concentrações de CQB e CQA, conforme consta na Tabela 5.

Também foram preparadas oito alíquotas de 200 µL de plasma branco de fontes distintas, sendo quatro normais, dois lipêmicos e dois hemolisados. Aos tubos de plástico de 2 mL contendo essas amostras plasmáticas, foram adicionados 100 µL de acetonitrila:água, (70:30, v/v), que então foram submetidas ao procedimento de extração (tópico 8.6). Em seguida, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo plástico, ao qual foram adicionados 500 µL de água contendo os analitos e PIs, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA. Estas amostras correspondem às amostras FD.

Para cada nível de concentração, foi estimado o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno, comparando-se as respostas das amostras FD com as respostas em solução, por meio da seguinte equação:

EQUAÇÃO 3

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} \div \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} \div \text{Resposta do PI em solução}}$$

O efeito matriz é considerado não significativo quando o coeficiente de variação dos FMNs de todas as amostras é inferior a 15% (BRASIL, 2012).

8.7.8. Efeito Residual

Para a avaliação deste efeito durante a validação, foi realizada a injeção de uma amostra branco de plasma seguida pela injeção de uma amostra de plasma fortificado na concentração do LSQ (Tabela 5). Em seguida, a amostra branco de plasma foi injetada mais duas vezes.

Os resultados obtidos das reinjeções da amostra branco de plasma foram comparados com os resultados obtidos de amostras do LIQ. É considerado como ausência de efeito residual quando as respostas dos potenciais picos interferentes presentes nas amostras branco reinjetadas, nos mesmos tempos

de retenção dos analitos, são inferiores a 20% das respostas dos analitos nas amostras LIQ e, para o PI, quando forem inferiores a 5% da sua resposta.

8.7.9. Estabilidade

8.7.9.1. Estabilidade dos analitos em plasma

Para cada ensaio de estabilidade em plasma, alíquotas de 200 μL foram adicionadas de 50 μL de solução de trabalho de PIs e de 50 μL de solução de trabalho dos analitos, de modo a obter para os analitos concentrações correspondentes ao CQB e CQA, e então homogeneizadas em vórtex durante um minuto. Foram preparadas triplicatas de cada nível de concentração.

Para o teste de estabilidade de curta duração, essas amostras fortificadas foram mantidas sobre a bancada, em temperatura ambiente, por 6 horas. Após, foi realizado o procedimento de extração, de acordo com o mencionado no tópico 8.6. Por fim, as amostras foram analisadas por CLUE-EM.

No ensaio de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras fortificadas com os PIs e os analitos foram congeladas por 12 horas ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, então, descongeladas à temperatura ambiente. Após o descongelamento das amostras, estas foram novamente congeladas ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) por mais um período de 12 h, e assim sucessivamente, até completar três ciclos de congelamento e descongelamento. Após todo esse processo, as amostras foram submetidas ao processo de extração, explicado no item 8.6, e então injetadas no sistema CLUE-EM.

Para a condução da estabilidade de longa duração, as amostras fortificadas foram congeladas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 30 dias. Decorrido este período, as amostras foram extraídas como descrito no tópico 8.6 e em seguida foram analisadas quantitativamente.

Já para a análise de estabilidade pós-processamento, após a fortificação das amostras com as soluções de trabalho dos PIs e dos analitos as amostras foram agitadas e submetidas à extração, conforme item 8.6. Então, as amostras foram armazenadas no gerenciador de amostras ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, após 8 horas, injetadas no sistema CLUE-EM e quantificadas.

As amostras foram consideradas estáveis quando as respostas se apresentaram dentro do intervalo de 15% do valor nominal, com base nas concentrações determinadas por meio de uma curva de calibração recém preparada.

8.7.9.2. Estabilidade dos analitos em solução

Para o ensaio de estabilidade em solução foram preparadas soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) e de trabalho (1000 ng.mL^{-1}) de acordo com os itens 8.4.1 e 8.4.2.

As soluções estoques foram armazenadas em *freezer* a $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 dias enquanto as soluções de trabalho permaneceram sobre a bancada por 6 horas em temperatura ambiente e na geladeira ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 72 horas. Decorrido o período de tempo, as amostras foram diluídas com o objetivo de obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA. Os resultados obtidos com as amostras deste ensaio foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém preparadas, nos mesmos níveis de concentração. Foram consideradas estáveis as soluções em estudo que apresentaram desvios inferiores a 10% em relação às respostas das soluções recém preparadas.

8.8. APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de plasmas de pacientes diabéticos e voluntários. O protocolo experimental relacionado e a esta etapa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CAAE 43237815.1.3001.0102).

Amostras de 40 pacientes diabéticos foram obtidos de exames de rotina do ambulatório do Hospital de Clínicas e após foram congeladas até o momento da análise, sem saber quais antidiabéticos eram utilizados.

Com relação aos 16 voluntários, estes foram informados sobre todos os procedimentos e possíveis riscos vinculados ao estudo, e após assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido anteriormente a participação no estudo. Cada dois voluntários receberam uma única dose de um destes fármacos: Diabinese® (clorpropamida 250 mg), Glibeneck® (glibenclamida 5

mg), Azukon MR® (gliclazida 30 mg), Betes® (glimepirida 4 mg), cloreto de metformina 500 mg, Starlix® (nateglinida 120 mg), Piotaz® (cloreto de pioglitazona 30 mg) e Galvus® (vildagliptina 50 mg). Diabinese®, Glibeneck®, Azukon MR®, Betes®, Starlix® foram administrados antes do café da manhã, enquanto o cloreto de metformina, Piotaz® e Galvus® foram após o café da manhã. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético di-potássico (EDTA-K2) após 1,5 e 2,5 horas da administração oral do fármaco. Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas a 4000 rpm por 6 minutos em temperatura ambiente e o plasma foi separado e congelado a -40 °C até a análise.

A aplicação não foi realizada para a rosiglitazona, devido a este fármaco não ser comercialmente disponível no Brasil.

8.8.1. Preparação das amostras para aplicação do método

Alíquotas de 200 µL do plasma dos pacientes e dos voluntários foram descongeladas à temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 50 µL de diluente e 50 µL de solução de trabalho dos PIs, obtendo concentração analítica final para os PIs de 75 µg.mL⁻¹ para sulfaquinoxalina e 200 µg.mL⁻¹ para isoniazida. As amostras foram agitadas em vórtex por um minuto. Após, as amostras foram submetidas ao processo de extração, quando foram adicionados 700 µL de acetonitrila com 1% de ácido fórmico e as amostras foram novamente agitadas em vórtex por três minutos. Com isso, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 minutos a 4° C. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram separados e diluídos na proporção 1:2 com água, v/v, de modo a obter uma solução final de 50:50 de solvente orgânico (acetonitrila com 1% de ácido fórmico):água, v/v. As amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm, 4°C por 10 minutos, para assim serem injetadas no sistema CLUE-EM.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. SELEÇÃO DOS PADRÕES INTERNOS

Com o objetivo de compensar erros aleatórios e sistemáticos, foram estabelecidos como padrões internos a sulfoquinoxalina e a isoniazida, adicionadas em concentrações constantes às amostras. Essas substâncias foram escolhidas por não estarem presentes nas amostras de pacientes e por apresentarem tempo de retenção próximos ao dos analitos, sofrendo, assim, os mesmos efeitos de supressão e iônica e coelundo com os mesmos interferentes que os analitos.

A isoniazida é um medicamento utilizado para o tratamento de tuberculose, sendo somente utilizada para o tratamento de tuberculose. Foi acrescentada como PI por ser altamente polar e por apresentar, assim, um baixo tempo de retenção, como a metformina e a vildagliptina.

Já a sulfaquinoxalina representa um antimicrobiano usado especialmente no tratamento de coccidiose, sendo que seu uso é proibido em humanos. Foi selecionado como PI por conter características físico-químicas e estrutura semelhante às das sulfonilureias, e por apresentar tempo de retenção próximo à maioria dos antidiabéticos.

9.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS

A primeira etapa durante o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a otimização dos parâmetros espectrométricos por infusão direta de soluções contendo os analitos. Ou seja, nessa etapa o espectrômetro de massas não está acoplado ao cromatógrafo. Inicialmente, os parâmetros espectrométricos foram variados de forma a obter a melhor intensidade de sinal analítico para todos os analitos e PIs. A fonte de ionização utilizada foi *Electrospray*, pois apresenta vantagens como alta sensibilidade e seletividade, compatibilidade com CL e capacidade de

ionizar compostos de média a alta complexidade, mesmo na presença de matrizes complexas como o plasma.

O modo positivo de ionização foi escolhido uma vez que os analitos apresentam grupos funcionais que facilmente aceitam um próton, H^+ , como aminas, amidas e ésteres, e com base no relatado em outros estudos presentes na revisão sistemática.

Definido o modo de ionização, foi realizada a seleção da substância aditiva e sua concentração para auxiliar na ionização dos analitos. Foram testados os aditivos formiato de amônio e ácido fórmico, sendo que o ácido fórmico a 0,1% foi o que apresentou as maiores intensidades de sinal para os nove antidiabéticos em estudo e também para os PIs.

Ainda durante a infusão, foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, tendo sido definidas as seguintes condições:

- Voltagem do capilar: +400 V;
- Voltagem do cone: 30 V;
- *Source offset*: 60 V;
- Temperatura da fonte: 150°C;
- Temperatura de dessolvatação: 500°C;
- Gás do cone: 50L/h;
- Gás de dessolvatação: 800L.h⁻¹;
- Tempo de aquisição dos dados: 4,50 minutos.

A energia de colisão foi de 4 V na aquisição em baixa energia e rampa de colisão de 20 a 40 V na aquisição em alta energia. A faixa de leitura de massas foi estabelecida com base nas massas dos analitos, sendo definido o intervalo entre 50 a 600 m/z . A massa de cada íon molecular dos analitos no modo positivo de ionização e os erros de massa obtidas experimentalmente está descrita na Tabela 6.

TABELA 6 – ÍONS MOLECULARES DE CADA COMPOSTO

Composto	Massa Molecular (Da)	Erro de massa (ppm)	Íon molecular [M+H] ⁺ (m/z)
Cloridrato de Metformina	129,1014	1,082871038	130,1092
Clorpropamida	276,0335	-0,809468187	277,0413
Glibenclamida	493,1438	-1,23404191	494,1516
Gliclazida	323,1303	1,628555748	324,1381
Glimepirida	490,2250	-0,768585158	491,2328
Isoniazida	137,0589	0,628522081	138,0667
Nateglinida	317,1990	4,760207355	318,2068
Pioglitazona	356,1195	3,071574671	357,1273
Rosiglitazona	357,1147	1,314913586	358,1225
Sulfaquinoxalina	300,0681	-3,621438044	301,0759
Vildagliptina	303,1947	0,332142161	304,2025

FONTE: O autor (2016)

Ao término da otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas através da infusão, o método cromatográfico foi desenvolvido. Os parâmetros cromatográficos testados foram baseados em dados da revisão sistemática.

Inicialmente, foram testadas diferentes colunas. Entretanto, quando uma variedade de analitos com polaridades tão diferentes é analisada, colunas muito apolares ou polares tendem a fornecer cromatografias ineficientes, conforme observado nos resultados da revisão sistemática. Por isso, colunas de polaridade intermediária são mais indicadas para este tipo de estudo. Os analitos apresentaram melhor perfil cromatográfico com a utilização da coluna ciano, de média polaridade, apta a separar compostos polares e apolares simultaneamente.

Em seguida, foram avaliadas diferentes composições e tipos de eluição da fase móvel, assim como diferentes vazões de fluxos, volumes de injeção e temperaturas de forno da coluna. Com base nas condições testadas, os melhores resultados de separação e ionização dos compostos foram obtidos nessas condições:

- Coluna: *Acquity UPLC* ®HSS *Cyano* (100 x 2,1 mm, 1,8 µm), *Waters Corporation* (Irlanda);

- Fase móvel: (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, eluída em modo gradiente, conforme segue:
 - Tempo 0 - 0,5min: 98% A;
 - Tempo 0,5 - 3,50min: 98-30% A;
 - Tempo 3,50 - 3,51min: 30-5% A;
 - Tempo 3,51 - 4,50min: 5% A;
 - Tempo 4,50 - 4,51min: 5-98% A;
 - Tempo 4,51-6,50min: 98% A;
- Fluxo da fase móvel: 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;
- Temperatura de forno: 40 $^{\circ}\text{C}$;
- Volume de injeção: 5 μL .

O cromatograma e os espectros obtidos para cada analito e PI no seu respectivo tempo de retenção e após as condições otimizadas podem ser observados nas Figuras 9 e 10.

FIGURA 9 – CROMATOGRAMA OBTIDO DA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 150 $\text{NG}\cdot\text{ML}^{-1}$ DOS SEGUINTE ANALITOS: CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA.

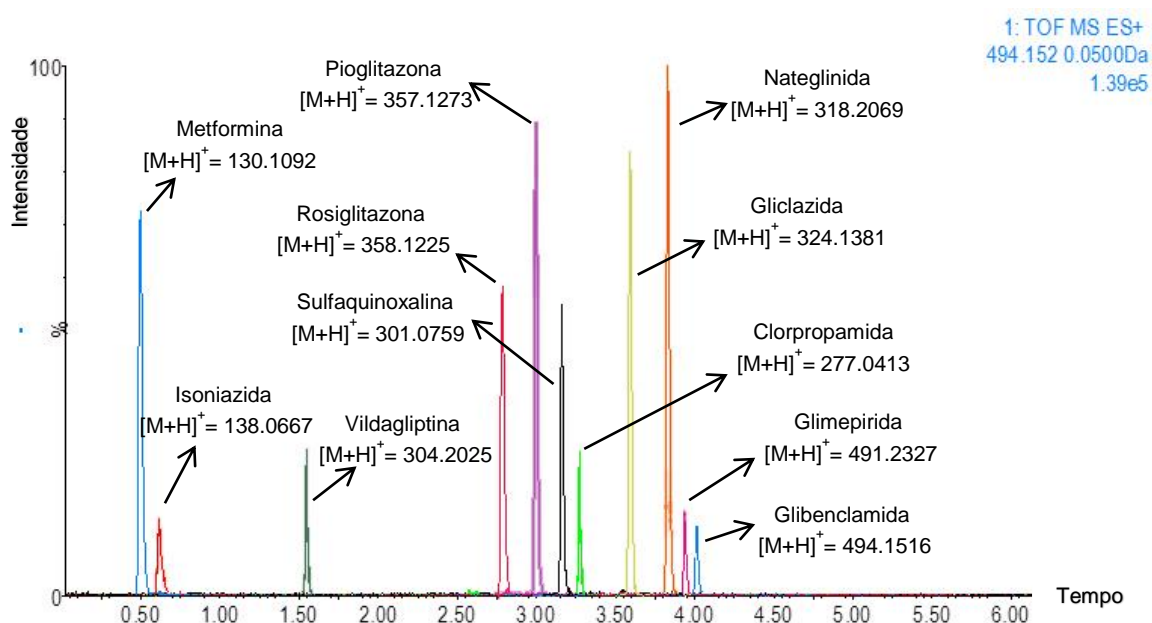
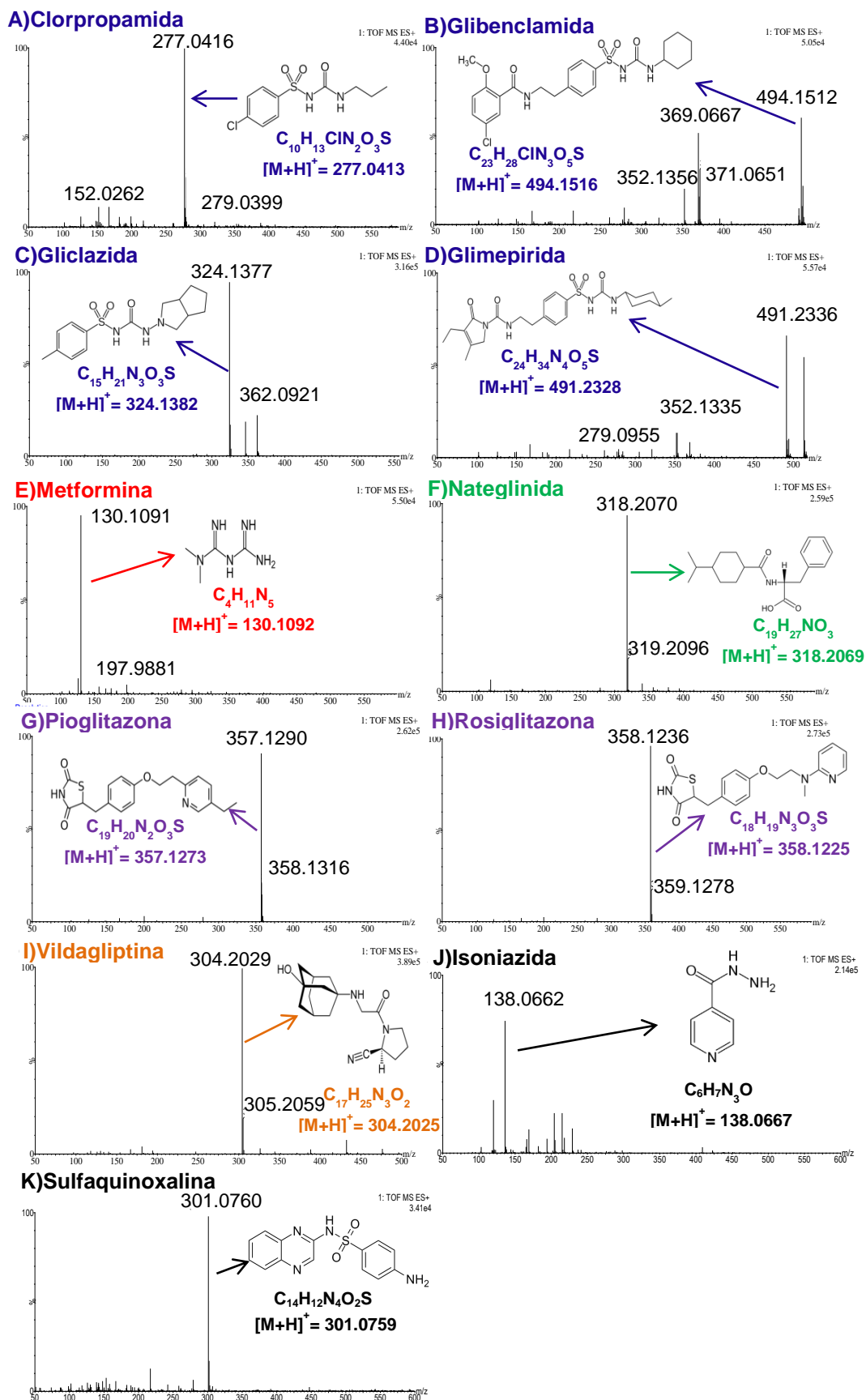


FIGURA 10 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DOS ANALITOS CLORPROPAMIDA (A), GLIBENCLAMIDA (B), GLICLAZIDA (C), GLIMEPIRIDA (D), METFORMINA (E), NATEGLINIDA (F), PIOGLITAZONA (G), ROSIGLITAZONA (H) E VILDAGLIPTINA (I) A 150 NG.ML⁻¹ E DOS PADRÕES INTERNOS ISONIAZIDA (200 NG.ML⁻¹) (J) E SULFAQUINOXALINA (75 NG.ML⁻¹) (K) (EM PLASMA A PARTIR DOS SEUS RESPECTIVOS TEMPO DE RETENÇÃO).

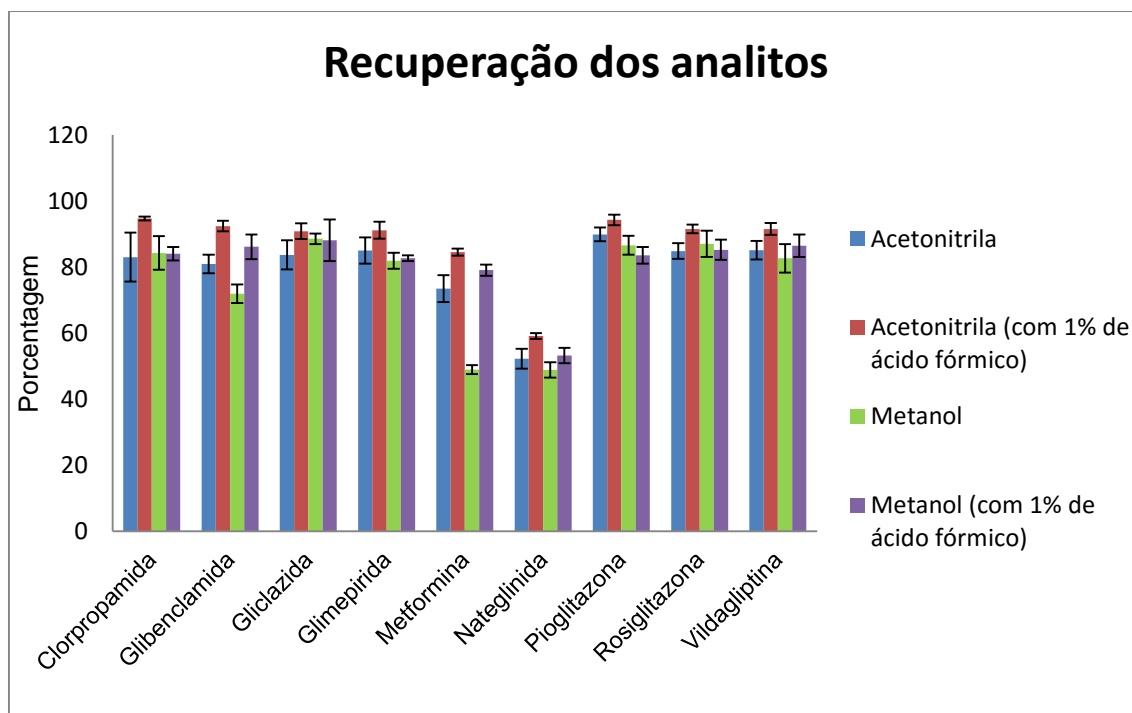


9.3. TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO

A extração por precipitação de proteínas foi definida por ser a mais utilizada, de acordo com o evidenciado pela revisão sistemática, bem como por ser um método simples, rápido, de baixo custo e pela aplicabilidade tanto em compostos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, como é o caso do grupo de analitos em estudo.

Foram testados quatro agentes precipitantes, sendo estes: acetonitrila, acetonitrila com 1,0% de ácido fórmico, metanol e metanol com 1,0% ácido fórmico. Destes, a acetonitrila com 1% de ácido fórmico foi escolhida, por apresentar maior recuperação dos analitos e por ser o agente mais reprodutível (apresentou os menores coeficientes de variação para os analitos e PIs). A comparação entre os quatro agentes precipitantes testados é demonstrada na Gráfico 4.

GRÁFICO 4 – RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES.



FONTE: O autor (2016)

9.4. VALIDAÇÃO

9.4.1. Limites de detecção e limite inferior quantificação

Por meio da relação sinal/ruído, foi possível notar que o método apresenta alta sensibilidade para os fármacos em estudo. Os valores obtidos de LD (relação sinal ruído ≥ 3) e LIQ (relação sinal ruído > 5) para os analitos em estudos estão demonstrados na Tabela 7. Destaca-se que os valores de LIQ foram estabelecidos conforme o valor esperado para estudos de monitoramento terapêutico destes fármacos, e não apenas como o valor mais baixo quantificável.

TABELA 7 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM ESTUDO EM PLASMA

Analitos	Limite de detecção (ng.mL⁻¹)	Limite de quantificação (ng.mL⁻¹)
Clorpropamida	10	50
Glibenclamida	1,25	12,5
Gliclazida	1,25	5
Glimepirida	2,5	12,5
Metformina	2,5	25
Nateglinida	5	50
Pioglitazona	1,25	25
Rosiglitazona	1,25	12,5
Vildagliptina	1,25	12,5

9.4.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada em plasma humano normal, lipêmico e hemolisado. Como demonstrado na Figura 11 e 12, as respostas dos picos de interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos e dos PIs foram inferiores a 20% e 5% destes, respectivamente. Desta forma, é possível afirmar que o método é seletivo.

FIGURA 11 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM A CLORPROPAMIDA (B), GLIBENCLAMIDA (C), GLICLAZIDA (D), GLIMEPIRIDA (E), METFORMINA (F), NATEGLINIDA (G), PIOGLITAZONA (H), ROSIGLITAZONA (I) E VILDAGLIPTINA (J).

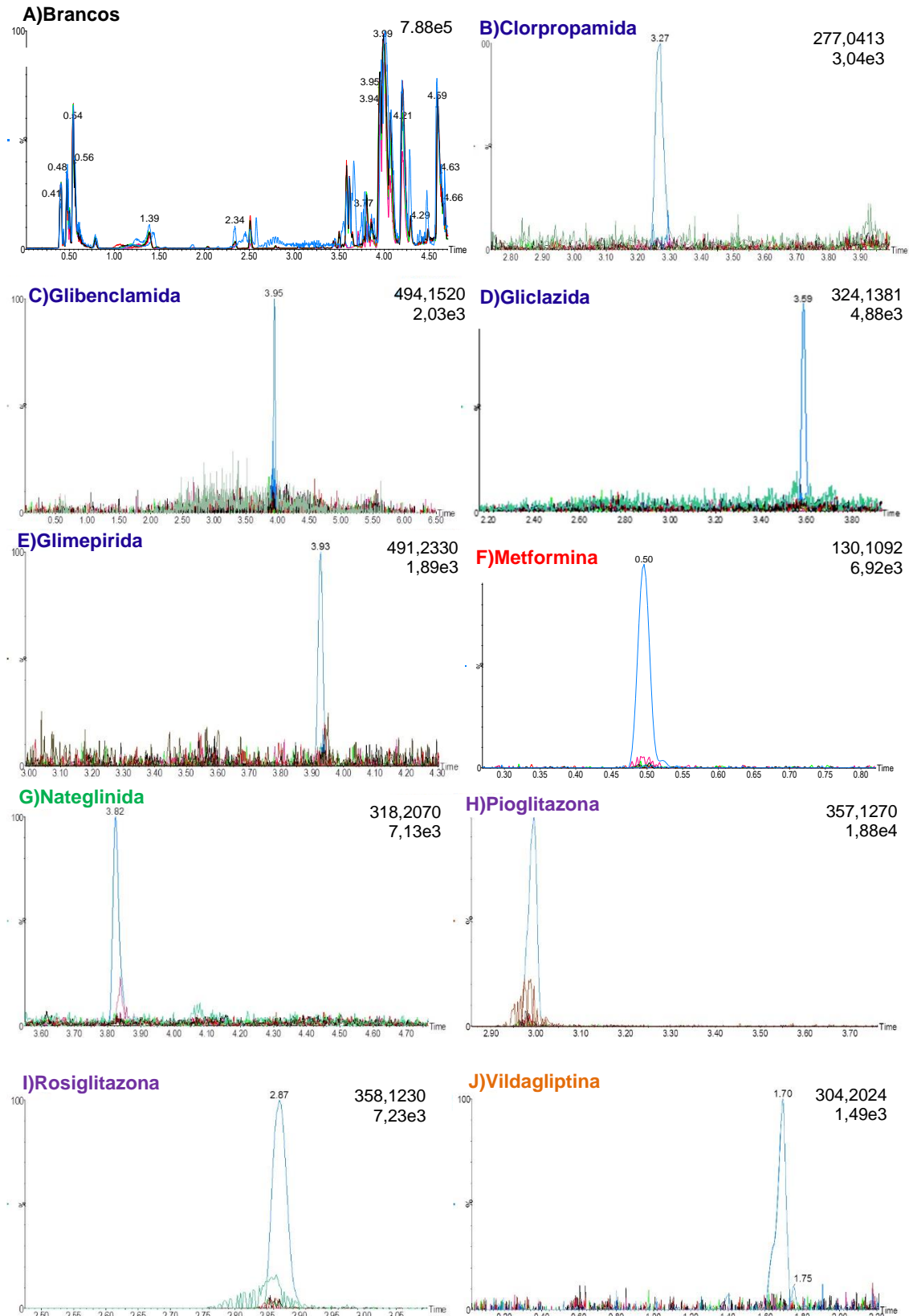
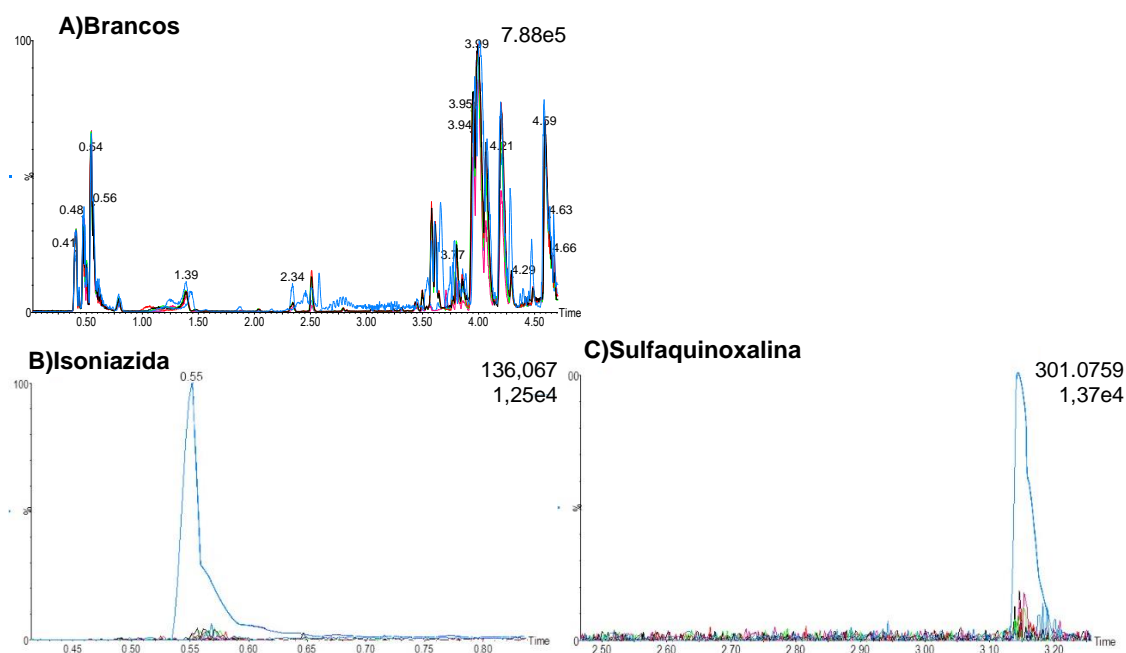


FIGURA 12 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM A ISONIAZIDA (B) E SULFAQUINOXALINA (C).



9.4.3. Curva de calibração

O intervalo da curva de calibração foi estabelecido com base na aplicabilidade do método, sendo estimado por meio de estudos farmacocinéticos (LETENDRE et al., 1986; WEAVER et al., 2001; BUDDE et al., 2003; KIM et al., 2003; BAUER et al., 2003; XUE et al., 2003; SABIA et al., 2004; WANG et al., 2004; MISTRI et al., 2007; ODUNOLA et al., 2007; GEORGITA et al., 2007; HE, J. et al., 2007; MARQUES et al., 2007; ZHANG et al., 2007; MALLI et al., 2007; HU et al., 2009; HAN et al., 2009; CHEN et al., 2011; SARKAR et al., 2011; HESS et al., 2011; SHIN et al., 2011; ZHU et al., 2012; JAGADEESH et al., 2013; POLAGANI et al., 2013; NI et al., 2014; VIANA et al., 2014; KARRA et al., 2014; QIU et al., 2014)

A curva de calibração confirmou que há relação linear entre as áreas dos picos dos analitos divididos pelas áreas dos picos dos PI versus a relação da concentração dos analitos sobre concentração do PI. Após três dias de ensaios, as curvas foram aprovadas por apresentarem no mínimo 75% dos padrões de

calibração com desvios inferiores a 20% em relação à concentração nominal do LIQ e 15% para os outros níveis da curva de calibração (TABELA 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16). Além disso, destaca-se que as curvas apresentaram índice de correlação superior a 0,99, conforme demonstrado nas Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21.

FIGURA 13 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLORPROPAMIDA NO INTERVALO DE 50 A 450 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Clorpropamida
 Correlation coefficient: $r = 0.995886$, $r^2 = 0.991789$
 Calibration curve: $0.0439475 * x + -0.370929$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

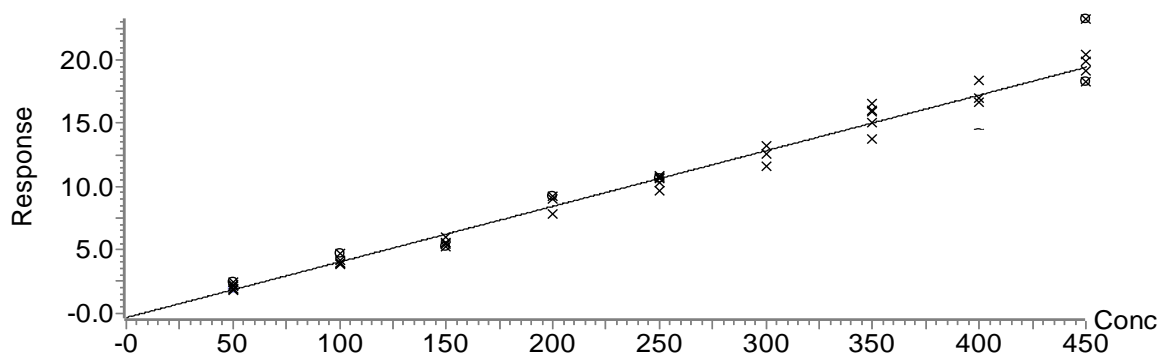


TABELA 8 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLORPROPAMIDA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1º DIA		2º DIA		3º DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
50	3,3	0,98	6,04	2,86	7,25	-2,93
100	8,10	4,67	5,21	-9,8	8,14	-0,61
150	5,09	-8,35	6,69	5,95	8,65	1,84
200	8,70	2,90	11,51	1,15	12,02	-4,1
250	0,49	1,58	4,18	0,34	6,68	5,88
300	6,29	-2,07	1,93	-0,10	11,07	1,44
350	3,27	4,55	8,65	-0,34	9,42	7,22
400	8,75	1,48	6,87	6,75	9,34	-6,13
450	4,06	-0,83	4,23	0,31	7,34	-1,76

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 14 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIBENCLAMIDA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Glibenclamida
 Correlation coefficient: $r = 0.996429$, $r^2 = 0.992870$
 Calibration curve: $0.0782964 * x + -0.0627008$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

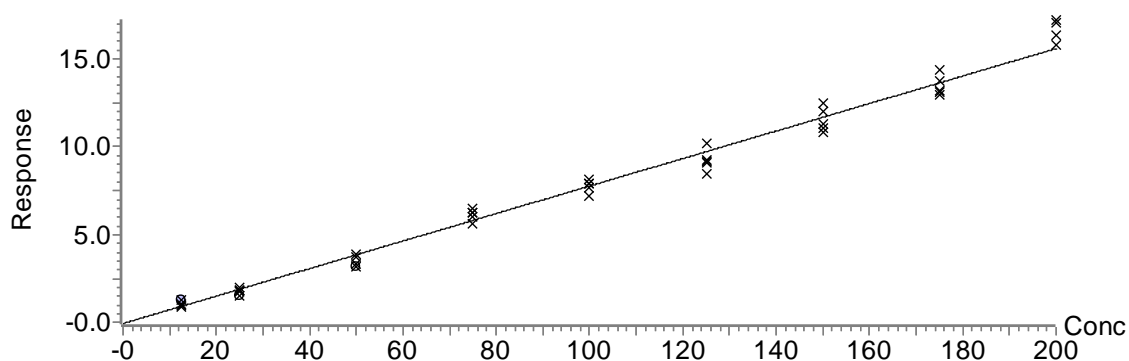


TABELA 9 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIBENCLAMIDA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1° DIA		2° DIA		3° DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
12,5	7,78	9,86	6,97	3,20	7,18	-6,67
25	7,88	-3,20	4,87	-1,60	8,20	0,29
50	9,71	-13,98	9,76	-0,80	9,32	-0,26
75	5,77	10,62	5,50	2,17	6,73	4,57
100	3,93	3,55	2,75	1,76	6,03	-8,76
125	11,58	4,21	6,02	-2,00	5,36	-5,30
150	3,88	-2,09	5,21	-3,17	4,19	-5,60
175	2,67	-2,13	3,31	-2,75	10,09	-1,43
200	2,01	0,71	2,75	8,08	3,56	1,16

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 15 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLICLAZIDA NO INTERVALO DE 5 A 100 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Gliclazida
 Correlation coefficient: $r = 0.998266$, $r^2 = 0.996536$
 Calibration curve: $2.60897 * x + -4.76184$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

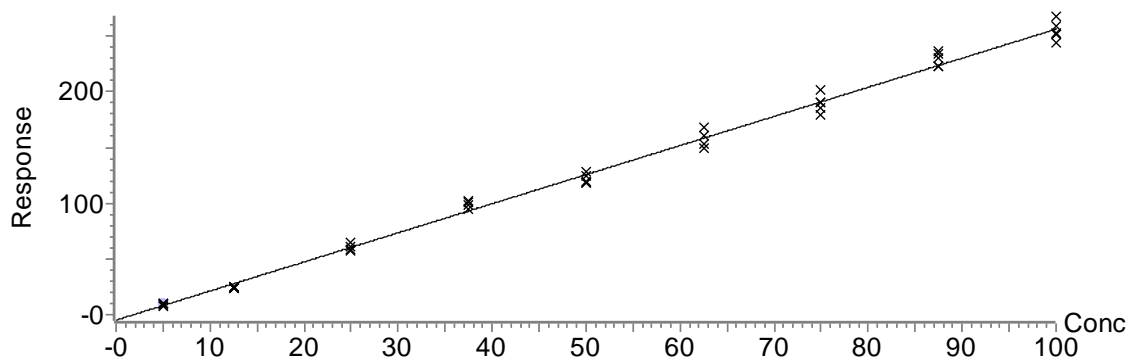


TABELA 10 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLICLAZIDA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1° DIA		2° DIA		3° DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
5	10,26	7,33	7,09	6,66	8,86	10,33
12,5	9,55	-5,86	2,65	-9,60	2,99	-6,13
25	6,36	-5,68	3,24	-0,26	2,67	-2,66
37,5	7,64	1,68	1,89	7,55	6,02	-3,64
50	3,69	-7,86	3,74	-1,53	5,46	-6,46
62,5	6,12	6,82	4,81	1,33	2,32	-5,01
75	3,52	3,51	3,47	-2,22	4,19	0,57
87,5	4,48	-4,49	2,84	2,81	9,20	-0,49
100	4,78	-0,43	4,57	-0,50	7,17	5,86

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 16 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIMEPIRIDA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Glimepirida
 Correlation coefficient: $r = 0.994276$, $r^2 = 0.988584$
 Calibration curve: $0.0555044 * x + -0.129539$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

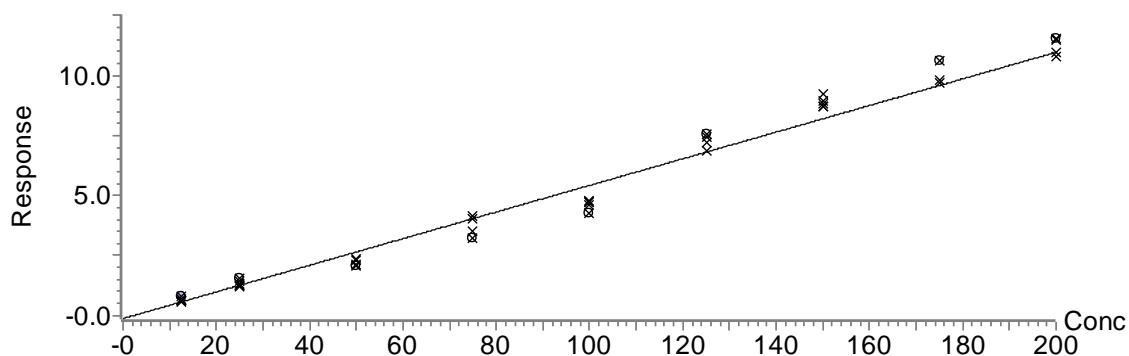


TABELA 11 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLIMEPIRIDA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1° DIA		2° DIA		3° DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
12,5	4,64	14,67	2,90	-0,80	8,79	-6,67
25	7,97	2,93	10,25	-3,06	7,78	-0,81
50	4,98	-12,2	13,64	-4,00	9,18	3,00
75	8,34	-2,48	6,50	1,77	12,23	-0,80
100	2,70	-12,4	5,35	-5,13	4,98	-3,40
125	4,10	5,81	2,91	9,69	1,89	-4,72
150	1,54	8,13	5,50	0,6	6,17	-2,06
175	4,87	5,04	7,04	-0,70	5,29	4,91
200	3,10	1,41	7,03	-1,61	1,05	1,68

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE METFORMINA NO INTERVALO DE 25 A 400 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Metformina
 Correlation coefficient: $r = 0.995069$, $r^2 = 0.990161$
 Calibration curve: $3.61957 * x + 22.3735$
 Response type: Internal Std (Ref 11), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

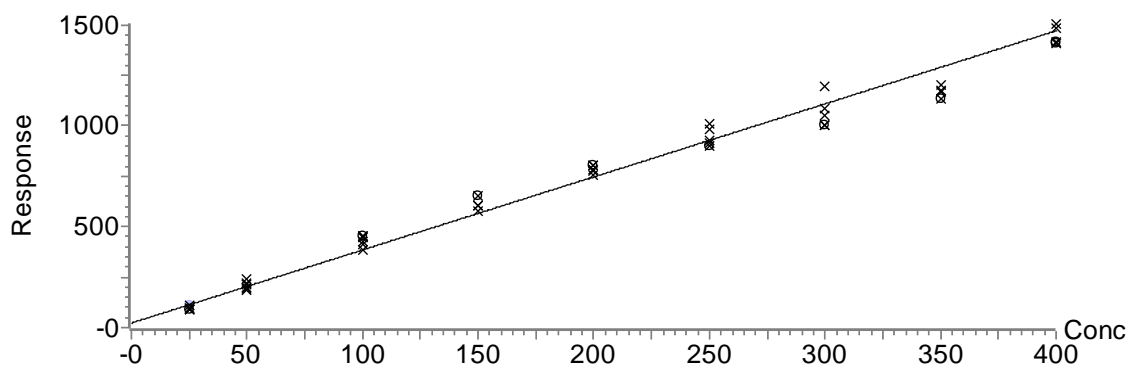


TABELA 12 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METFORMINA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1° DIA		2° DIA		3° DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
25	10,63	-2,00	4,14	-13,46	10,69	-12,40
50	12,06	13,04	6,82	5,33	8,55	-3,66
100	5,96	11,66	7,88	9,36	8,67	8,06
150	3,72	10,04	1,57	2,02	3,11	5,35
200	2,43	3,03	4,94	9,80	2,23	2,55
250	8,96	-0,17	6,45	0,86	4,04	1,62
300	7,71	0,52	5,59	-0,21	6,85	0,34
350	2,90	-9,76	7,03	-6,77	1,37	-8,42
400	8,83	-5,50	7,71	-8,39	0,67	1,91

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 18 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE NATEGLINIDA NO INTERVALO DE 50 A 400 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Nateglinida
 Correlation coefficient: $r = 0.997618$, $r^2 = 0.995241$
 Calibration curve: $0.659118 * x + -38.0207$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

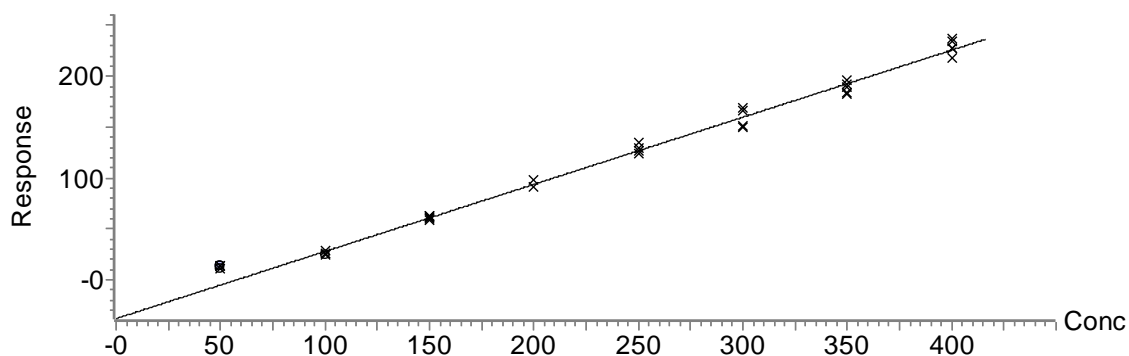


TABELA 13 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA NATEGLINIDA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1º DIA		2º DIA		3º DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
50	3,68	9,23	1,76	-1,36	1,09	1,93
100	9,57	-9,24	1,30	0,02	1,38	1,00
150	6,86	-2,66	0,24	3,36	4,26	-1,08
200	0,98	-9,25	3,44	1,69	6,15	-0,64
250	6,46	6,88	0,79	4,13	1,25	-2,26
300	5,80	6,20	2,01	-2,00	5,52	-3,97
350	3,83	-4,25	1,83	2,86	6,52	0,47
400	7,07	-2,09	2,49	-1,99	7,83	0,83

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 19 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PIOGLITAZONA NO INTERVALO DE 25 A 200 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Pioglitazona
 Correlation coefficient: $r = 0.994091$, $r^2 = 0.988218$
 Calibration curve: $5.77485 * x + 111.927$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

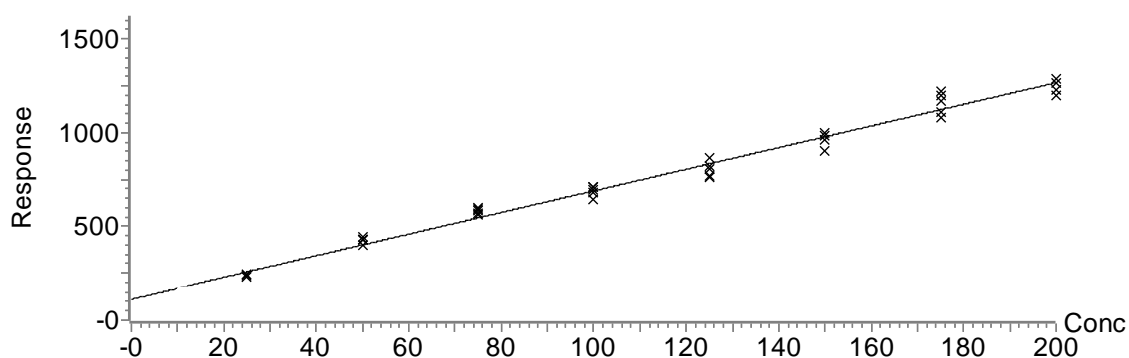


TABELA 14 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PIOGLITAZONA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1º DIA		2º DIA		3º DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
25	6,19	-12,27	2,87	-13,2	12,97	-2,66
50	7,86	7,67	2,63	11,86	3,39	3,73
75	3,18	10,04	1,77	10,40	3,85	8,97
100	6,85	9,63	5,74	-2,06	8,07	10,80
125	8,45	-4,13	6,90	-2,00	7,87	-0,48
150	8,16	-0,22	5,57	-5,73	7,06	1,06
175	12,32	2,17	5,68	2,59	3,91	-3,35
200	8,27	-4,36	3,02	-3,13	4,22	-0,78

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 20 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ROSIGLITAZONA NO INTERVALO DE 12,5 A 100 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Rosiglitazona
 Correlation coefficient: $r = 0.991308$, $r^2 = 0.982692$
 Calibration curve: $6.50477 * x + 47.5489$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

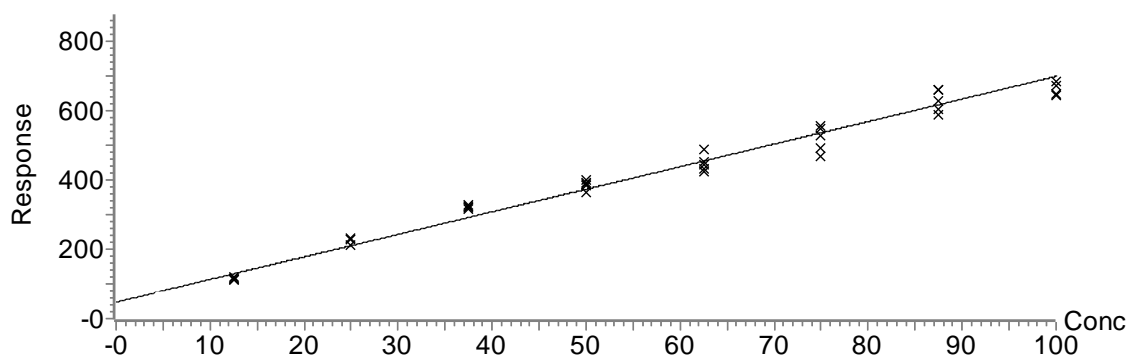


TABELA 15 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ROSIGLITAZONA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1° DIA		2° DIA		3° DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
12,5	4,88	-9,86	3,29	-14,67	14,94	-11,20
25	11,26	6,67	0,20	10,26	1,12	9,06
37,5	5,69	1,77	1,74	12,62	4,12	7,46
50	3,82	11,67	5,89	3,93	7,69	4,93
62,5	6,70	-3,30	7,02	-0,11	6,73	-,26
75	12,09	-3,28	9,13	-6,89	5,13	0,97
87,5	4,61	6,78	4,96	2,43	7,65	-1,71
100	6,47	-4,00	2,73	-6,80	2,99	-7,70

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

FIGURA 21 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE VILDAGLIPTINA NO INTERVALO DE 12,5 A 200 NG.ML⁻¹ EM PLASMA

Compound name: Vildagliptina
 Correlation coefficient: $r = 0.994547$, $r^2 = 0.989124$
 Calibration curve: $6.46407 * x + -46.552$
 Response type: Internal Std (Ref 11), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

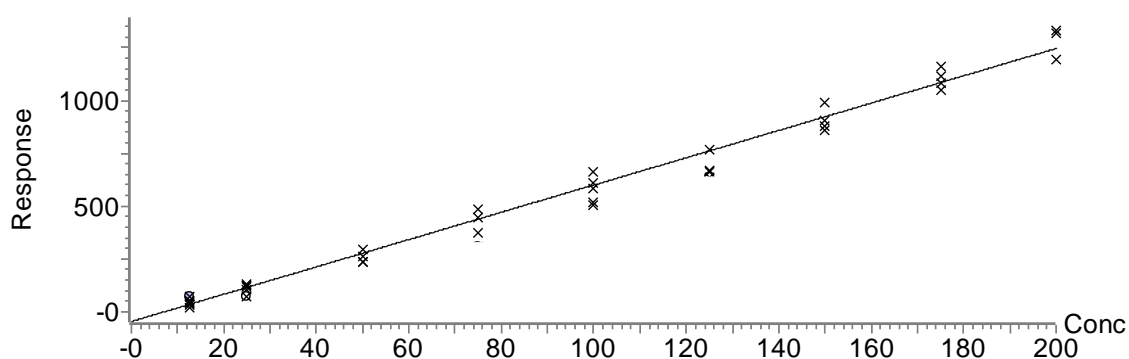


TABELA 16 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VILDAGLIPTINA

Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)*	1º DIA		2º DIA		3º DIA	
	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV %)	Exatidão (EPR %)
12,5	11,43	11,22	6,96	-8,80	7,48	-4,26
25	5,38	-1,06	10,22	4,66	11,14	0,53
50	9,87	-3,73	10,31	-3,73	1,14	0,86
75	11,64	-0,53	4,59	-0,88	6,24	1,60
100	5,68	2,83	3,15	8,76	12,62	-2,13
125	7,81	-7,76	4,02	3,92	4,08	1,30
150	7,65	6,35	0,37	-2,42	8,07	5,02
175	3,03	-0,34	5,84	-4,51	13,27	-2,30
200	7,39	4,01	7,17	-0,53	8,75	-7,06

NOTA: CV%, Coeficiente de variação; EPR%, Erro padrão relativo. *Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

9.4.4. Precisão e Exatidão

Estes ensaios foram realizados através de quintuplicatas das cinco concentrações de controle de qualidade: CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

O método pode ser considerado preciso e exato ao apresentar valores de CV e EPR inferiores a 20% para o CQ-LIQ, e inferiores a 15% para os demais controles de qualidade, tanto para a precisão e exatidão intracorrída, quanto para a precisão e exatidão intercorrída. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 17, evidenciando que o método é preciso e exato.

TABELA 17 – RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLUE-EM EM AMOSTRAS DE PLASMA

Analito	CQ	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)**	1° dia (n=5)		2° dia (n=5)		3° dia (n=5)		Intercorrída (n=15)	
			CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)
CLOR	CQ-LIQ	50	6,95	3,92	4,92	4,84	9,07	1,72	6,74	3,49
	CQB	100	8,20	0,54	4,06	-9,50	10,64	-1,10	8,01	-3,35
	CQM	250	4,61	-1,26	3,18	-0,23	8,80	3,96	6,13	0,82
	CQA	350	6,87	3,50	7,56	-2,31	6,72	7,52	7,40	2,90
	CQD	250	4,74	13,1	8,26	8,91	7,92	-1,69	9,24	6,19
GBC	CQ-LIQ	12,5	8,03	5,76	13,7	10,7	14,8	-1,60	11,0	4,96
	CQB	25	6,10	-1,84	9,59	-6,08	6,09	-1,20	7,61	-2,24
	CQM	100	6,86	-14,4	4,63	-0,02	5,39	-6,46	8,36	-6,97
	CQA	150	11,41	6,12	5,83	-1,21	8,80	-0,04	9,08	1,62
	CQD	1000	5,10	14,1	3,53	13,8	5,27	3,86	6,43	10,6
GCZ	CQ-LIQ	5	7,64	8,80	5,15	7,60	8,01	13,6	7,01	10,0
	CQB	12,5	7,92	3,36	2,75	10,4	2,20	-6,24	4,77	-6,66
	CQM	50	2,81	-8,52	3,43	-3,04	5,15	-4,32	4,46	-5,29
	CQA	75	2,55	3,62	4,32	-0,85	4,26	2,88	3,83	1,88
	CQD	500	4,35	6,10	3,38	4,25	6,79	-0,99	5,66	3,29
GMP	CQ-LIQ	12,5	-3,74	8,80	15,2	1,28	12,41	-1,60	11,3	2,82
	CQB	25	-5,69	3,04	7,72	-0,88	8,76	-0,88	7,16	0,42
	CQM	100	-2,08	-13,8	5,97	-1,88	3,15	-5,26	6,82	-6,98
	CQA	150	-1,48	7,71	4,21	0,14	8,82	1,98	5,76	3,09
	CQD	1000	5,81	1,33	5,13	-2,61	3,49	-10,7	7,40	-4,10

(CONCLUSÃO) TABELA 17 – RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLUE-EM EM AMOSTRAS DE PLASMA

Analito	CQ	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)**	1° dia (n=5)		2° dia (n=5)		3° dia (n=5)		Intercorrida (n=15)	
			CV	EPR	CV	EPR	CV	EPR	CV	EPR
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MET	CQ-LIQ	25	10,41	-2,56	9,08	-13,4	9,78	-15,6	11,4	-12,4
	CQB	50	8,86	-1,96	5,29	6,44	9,69	5,32	10,7	4,73
	CQM	200	11,22	3,94	5,02	10,6	2,57	3,77	5,19	7,31
	CQA	300	6,25	-0,01	4,89	-0,64	6,89	-2,81	5,75	-1,15
	CQD	2000	8,92	-4,98	6,21	-4,24	11,95	-5,92	9,17	-5,08
NAT	CQ-LIQ	50	3,08	8,20	1,84	-2,32	1,38	1,86	4,97	2,42
	CQB	100	7,84	-9,46	1,82	-0,24	2,46	-0,33	5,92	-2,90
	CQM	200	1,88	-9,97	2,52	1,37	5,16	-0,98	6,16	-3,13
	CQA	300	4,14	6,45	2,39	-1,58	5,19	-1,47	5,01	2,12
	CQD	2000	6,83	-2,68	4,15	-5,65	8,45	-10,9	7,82	-6,21
PIO	CQ-LIQ	25	7,46	-13,6	4,09	-11,1	11,75	-7,04	8,19	-10,5
	CQB	50	8,47	10,9	5,76	8,96	4,20	1,40	7,01	6,80
	CQM	100	7,13	14,1	4,78	-0,30	8,32	6,28	8,62	6,68
	CQA	150	8,96	-1,06	5,37	-3,30	5,91	-1,08	6,63	-2,98
	CQD	1000	5,68	-0,02	5,10	5,75	8,22	5,78	7,14	3,50
ROS	CQ-LIQ	12,5	4,62	-12,3	3,97	-15,3	10,25	-10,8	8,86	-11,5
	CQB	25	9,34	8,40	4,27	8,88	3,92	6,72	5,59	7,80
	CQM	50	6,13	8,08	4,18	3,84	7,06	9,04	5,97	5,91
	CQA	75	9,05	-3,48	8,02	-3,65	4,22	-0,37	6,41	-2,02
	CQD	500	3,72	0,63	3,54	2,96	5,76	3,59	4,65	2,26
VDP	CQ-LIQ	12,5	13,42	5,12	13,5	-9,76	6,49	-2,72	12,5	-2,45
	CQB	25	5,92	2,08	14,5	-3,68	8,50	-1,12	8,02	0,14
	CQM	100	10,28	-3,72	5,19	5,50	10,5	2,02	9,09	1,27
	CQA	150	13,78	-1,76	8,32	-7,92	5,78	4,64	7,83	1,09
	CQD	1000	12,9	1,24	5,48	-10,6	12,9	-4,50	12,5	-3,32
ISO*	-	200	12,19	-3,00	7,32	-0,02	9,19	0,02	8,24	-0,12
SULF*	-	75	13,11	6,20	13,3	1,18	14,70	1,70	14,1	1,69

NOTA: CV, coeficiente de variação; EPR, erro padrão relativo; CQ, controle de qualidade; CQ-LIQ, amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD, amostra de controle de qualidade de diluição; CLOR, clorpropamida; GBC, glibenclamida; GCZ, gliclazida; GMP, glimepirida; MET, metformina; NAT, nateglinida; PIO, pioglitazona; ROSI, rosiglitazona; VDP, vildagliptina; ISO, isoniazida; SULF, sulfoquinoxalina; *padrão interno. **Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

9.4.5. Recuperação

Os resultados de recuperação dos analitos e dos PIs utilizando o método de extração por precipitação de proteínas com acetonitrila e 1% de ácido fórmico podem ser visualizados na Tabela 18. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata e, para fins didáticos, foram demonstrados somente a média e o desvio obtido para cada analito.

A menor recuperação obtida foi para a metformina, com 61,60%. Este resultado está possivelmente associado à maior polaridade deste fármaco quando comparado aos demais compostos em estudo. Entretanto, o método de extração por precipitação de proteínas com acetonitrila e 1% de ácido fórmico foi considerado efetivo, visto que a recuperação foi reprodutível, precisa e consistente, apresentando coeficientes de variação inferiores a 10%.

TABELA 18 – RECUPERAÇÃO OBTIDA COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA CONTENDO 1% DE ÁCIDO FÓRMICO

Analito	Controle de qualidade	Concentração (ng.mL⁻¹)**	Recuperação (%)	CV (%)
Clorpropamida	CQB	100	83,32	6,13
	CQM	250	86,54	9,32
	CQA	350	84,54	7,48
Glibenclamida	CQB	25	75,33	5,35
	CQM	100	75,05	6,05
	CQA	150	80,43	7,43
Gliclazida	CQB	12,5	84,52	4,32
	CQM	50	80,55	5,96
	CQA	75	80,37	5,92
Glimepirida	CQB	25	78,43	7,64
	CQM	100	82,96	2,17
	CQA	150	80,35	6,05
Metformina	CQB	50	61,60	8,82
	CQM	200	62,56	9,54
	CQA	300	67,37	9,03
Nateglinida	CQB	100	75,05	5,76
	CQM	200	71,03	8,51
	CQA	300	76,31	7,33
Pioglitazona	CQB	50	79,94	1,40
	CQM	100	75,85	4,23
	CQA	150	76,88	3,93
Rosiglitazona	CQB	25	80,95	2,57
	CQM	50	83,43	3,66
	CQA	75	83,91	3,03
Vildagliptina	CQB	25	73,03	8,37
	CQM	100	76,65	5,37
	CQA	150	73,32	7,03
Isoniazida*	-	200	77,43	3,94
Sulfaquinoxalina*	-	75	84,54	2,89

NOTA: CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; C.V., Coeficiente de Variação; *padrão interno. **Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

9.4.6. Efeito Matriz

Após os cálculos dos fatores de matriz normalizado em plasma normal, lipêmico e hemolisado, por meio da comparação das áreas dos analitos obtidas com amostra FD com às áreas dos analitos em solução, nas mesmas concentrações, foi possível comprovar que o método não apresenta efeito matriz que comprometa a análise, visto que os valores de CV% dos FMN foram inferiores a 15%. Os resultados do ensaio de efeito matriz encontram-se na TABELA 19.

TABELA 19 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ

Analitos	Controle de qualidade	Concentração (ng.mL⁻¹)*	Média dos FMN ± DP	CV (%)
Clorpropamida	CQB	100	0,855 ± 0,096	11,28
	CQA	350	0,959 ± 0,112	11,74
Glibenclamida	CQB	25	0,509 ± 0,057	11,24
	CQA	150	0,592 ± 0,056	9,60
Gliclazida	CQB	12,5	0,959 ± 0,112	11,71
	CQA	75	1,173 ± 0,090	7,69
Glimepirida	CQB	25	0,638 ± 0,056	8,86
	CQA	150	0,770 ± 0,083	10,87
Metformina	CQB	50	0,632 ± 0,047	7,53
	CQA	300	0,626 ± 0,063	10,08
Nateglinida	CQB	100	0,700 ± 0,089	12,78
	CQA	300	0,880 ± 0,042	4,80
Pioglitazona	CQB	50	0,860 ± 0,044	5,09
	CQA	150	1,038 ± 0,046	4,47
Rosiglitazona	CQB	25	0,888 ± 0,080	9,09
	CQA	75	1,046 ± 0,042	4,04
Vildagliptina	CQB	25	3,927 ± 0,526	13,41
	CQA	150	3,936 ± 0,505	12,83

NOTA: FMN, fator matriz normalizado, DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração.

*Concentrações referentes à amostra diluída 10 vezes.

9.4.7. Efeito residual

O resultado deste ensaio mostrou que as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos e dos PIs foram inferiores a 20% das respostas dos analitos na amostra processada do LIQ e 5% da resposta dos PIs, respectivamente. Estes resultados demonstraram ausência de contaminantes relativos às análises anteriores, tanto para os nove analitos quanto para os PIs.

Os cromatogramas obtidos com plasma branco após as injeções de amostras processadas no LSQ estão apresentados nas Figura 22 e 23.

FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE ISONIAZIDA (A) E SULFAQUINOXALINA (B) SENDO (i) AMOSTRA PROCESSADA COM A CONCENTRAÇÃO DO LIQ E (ii) AMOSTRA BRANCO INJETADA APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA PROCESSADA DO LSQ

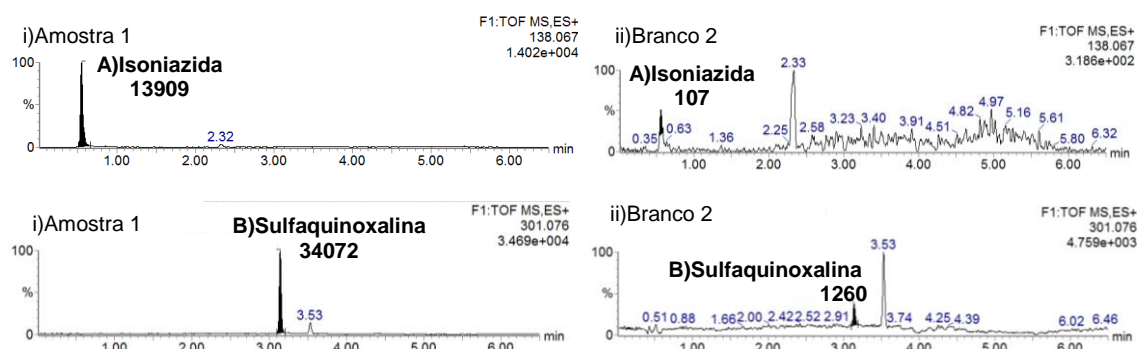
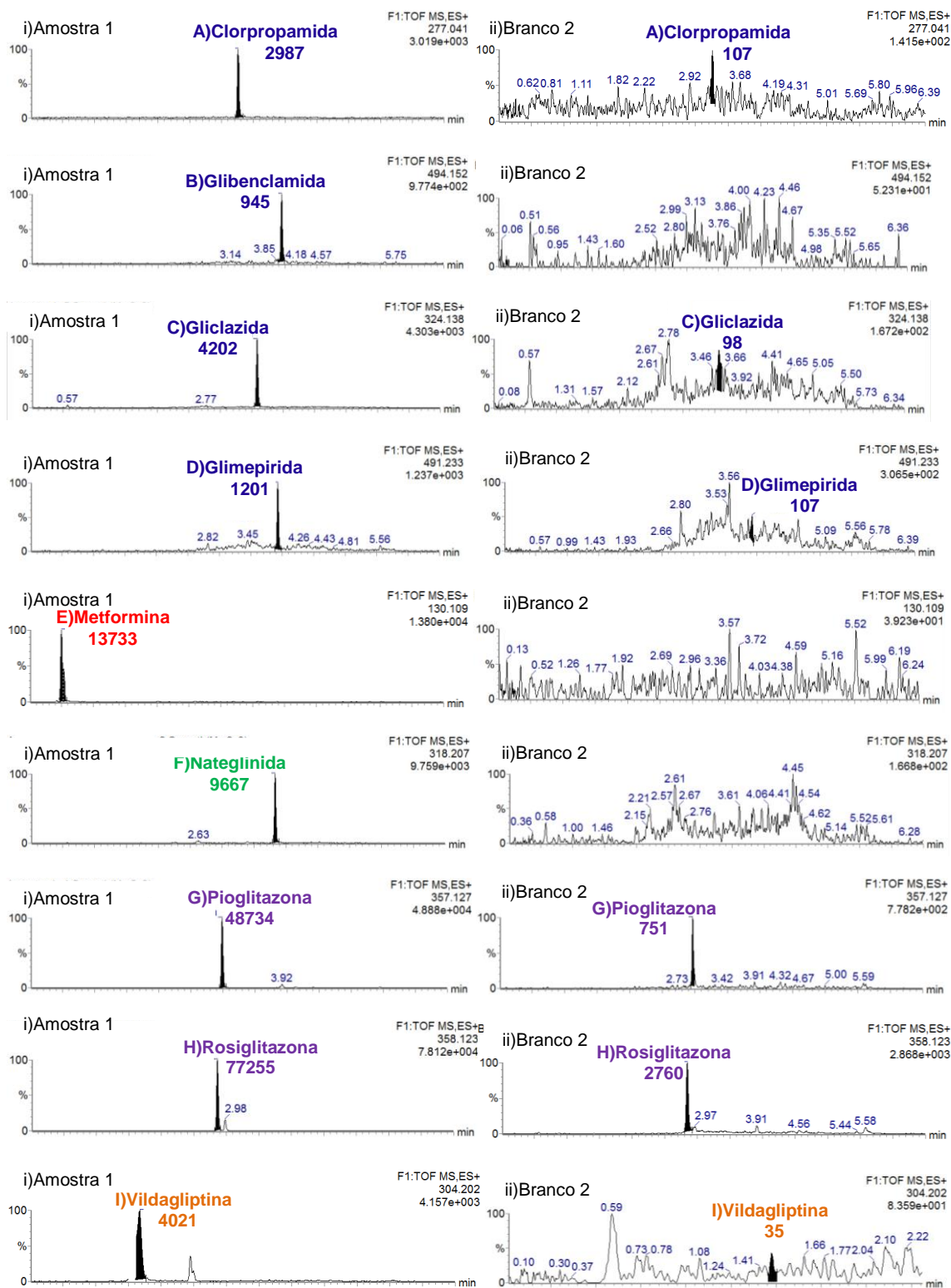


FIGURA 23 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE CLORPROPAMIDA(A), GLIBENCLAMIDA(B), GLICLAZIDA(C), GLIMEPIRIDA(D), METFORMINA(E), NATEGLINIDA(F), PIOGLITAZONA(G), ROSIGLITAZONA(H) E VILDAGLIPTINA(I) SENDO (i) AMOSTRA PROCESSADA COM A CONCENTRAÇÃO DO LIQ E (ii) AMOSTRA BRANCO INJETADA APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA PROCESSADA DO LSQ



9.4.8. Estabilidade

Os resultados da avaliação da estabilidade das substâncias de interesse em solução mostraram que os compostos foram estáveis em solução estoque (1 mg.mL^{-1}) por 30 dias a $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e em solução de trabalho ($10.000 \text{ ng.mL}^{-1}$) por 6 horas a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e por 72 horas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, como demonstrado na Tabela 20.

A avaliação dos resultados da estabilidade dos analitos em plasma mostraram que os analitos são estáveis após um período de 6 horas na bancada ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$), após 8 horas no gerenciador de amostras ($22 \text{ }^{\circ}\text{C}$), e após três ciclos de congelamento e descongelamento. Também, foi observado que os analitos foram estáveis no ensaio de estabilidade de longa duração, não sofrendo degradação significativa em 30 dias a $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os valores obtidos para estes ensaios podem ser encontrados na Tabela 21.

TABELA 20 – ESTABILIDADE DA CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA EM SOLUÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Condição do estudo	Concentração avaliada	Analito	CV (%)
30 dias (-40°C)	1 mg.mL ⁻¹	Clorpropamida	3,60
		Glibenclamida	5,24
		Gliclazida	2,59
		Glimepirida	2,08
		Metformina	3,02
		Nateglinida	1,92
		Pioglitazona	2,45
		Rosiglitazona	3,21
		Vildagliptina	2,80
		Isoniazida	3,46
Sulfaquinoxalina	1,94		
6 h (25°C)	1000 ng.mL ⁻¹	Clorpropamida	9,32
		Glibenclamida	7,04
		Gliclazida	6,48
		Glimepirida	8,79
		Metformina	4,38
		Nateglinida	5,75
		Pioglitazona	8,14
		Rosiglitazona	9,22
		Vildagliptina	6,70
		Isoniazida	4,35
Sulfaquinoxalina	5,99		
72 h (4°C)	1000 ng.mL ⁻¹	Clorpropamida	8,46
		Glibenclamida	3,36
		Gliclazida	2,94
		Glimepirida	4,69
		Metformina	4,73
		Nateglinida	8,89
		Pioglitazona	7,91
		Rosiglitazona	2,78
		Vildagliptina	9,50
		Isoniazida	3,97
Sulfaquinoxalina	1,49		

NOTA: CV, coeficiente de variação.

TABELA 21 – ESTABILIDADE DA CLORPROPAMIDA, GLIBENCLAMIDA, GLICLAZIDA, GLIMEPIRIDA, METFORMINA, NATEGLINIDA, PIOGLITAZONA, ROSIGLITAZONA E VILDAGLIPTINA EM PLASMA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Analito	Controle de qualidade	Concentração (ng.mL ⁻¹)*	Estabilidade após ciclos		Estabilidade de curta duração		Estabilidade de longa duração		Estabilidade pós-processamento	
			CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)
Clorpropamida	CQB	100	8,79	0,54	12,13	-4,66	8,93	-8,62	9,43	1,54
	CQA	350	7,08	5,27	11,82	-0,40	5,84	-5,38	5,32	3,22
Glibenclamida	CQB	25	8,45	5,60	12,99	-8,04	10,38	1,31	7,09	4,35
	CQA	150	7,94	-0,44	13,80	-7,84	12,31	-5,09	10,58	0,05
Gliclazida	CQB	12,5	3,73	-3,36	12,78	-8,56	4,76	3,46	8,99	-0,53
	CQA	75	3,76	1,52	5,44	-0,44	2,86	-0,85	4,55	-3,21
Glimepirida	CQB	25	7,94	-0,32	9,96	-5,77	10,10	8,68	7,43	-6,40
	CQA	150	8,45	4,78	12,75	-5,16	12,05	14,20	7,30	9,76
Metformina	CQB	50	12,28	8,02	12,45	-7,09	11,64	-1,92	8,99	10,64
	CQA	300	9,11	0,19	6,46	-10,75	5,17	-5,76	9,15	5,77
Nateglinida	CQB	100	9,34	-5,58	11,23	-8,69	4,46	-10,16	1,32	-5,89
	CQA	300	4,73	-1,16	10,64	-7,99	5,60	5,97	4,79	-4,66
Pioglitazona	CQB	50	3,86	-0,60	10,70	-5,80	9,62	-8,31	6,50	2,59
	CQA	150	7,81	-4,42	10,63	-8,02	8,89	-9,23	9,44	3,65
Rosiglitazona	CQB	25	7,38	0,97	9,27	0,67	10,49	1,80	5,36	4,39
	CQA	75	10,92	-8,64	12,63	-9,97	4,48	-1,83	3,99	5,59
Vildagliptina	CQB	25	12,59	-7,28	9,57	4,31	7,38	-2,04	7,73	-5,47
	CQA	150	11,72	-4,42	12,43	-4,69	10,64	-3,21	5,32	-2,53
Isoniazida	-	200	10,65	-13,50	-9,70	9,61	6,15	-0,34	9,83	-12,70
Sulfaquinoxalina	-	75	8,51	-10,88	11,95	-8,01	6,74	0,65	9,14	-9,08

NOTA: CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CV, coeficiente de variação; EPR, erro padrão relativo. Concentrações referentes a amostra diluída 10 vezes.

9.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de paciente diabéticos do Hospital de Clínicas do Paraná e também em amostras de voluntários que receberam uma única dose dos fármacos em estudo. A equação linear e os coeficientes de correlação obtidos foram: clorpropamida, $y=0,136029x+0,873097$ ($r=0,99060$); glibenclamida, $y=0,0930042x+0,203434$ ($r=0,9964$); gliclazida, $y=2,58971x+5,80569$ ($r=0,9965$); glimepirida, $y=0,177108x+0,104726$ ($r=0,996151$); metformina, $y=4,95398x+48,022$ ($r=0,9957$); nateglinida, $y=0,688125x+41,6563$ ($r=0,994288$); pioglitazona, $y=5,95714x+86,2663$ ($r=0,993859$); vildagliptina, $y=4,74775x+14,6866$ ($r=0,9938$). Além disso, todos os controles de qualidade apresentaram desvios inferiores a 15%.

As amostras de plasma obtidas de pacientes sobre o tratamento de glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina e vildagliptina apresentaram uma concentração plasmática de: $128,1 \pm 72,9$ ($n=10$), $1515,5 \pm 10,6$ ($n=2$), $315,6 \pm 90,1$ ($n=6$), $315,7 \pm 80,1$ ($n=20$) e $323,5 \pm 41,7$ ($n=2$) ng.mL^{-1} , respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o intervalo terapêutico e a concentração plasmática relatados na literatura (HE, Y.-L. et al., 2007; MATSUKI et al., 2007; NARAHARISSETTI et al., 2007; YARDIMCI et al., 2007; MALLI et al., 2007; GEDEON et al., 2008; DELL'AGLIO et al., 2009; HE et al., 2009; FRID et al., 2010; KAWAGUCHI-SUZUKI et al., 2014).

A média da concentração plasmática obtida dos voluntários foram: clorpropamida ($25590,1 \pm 3040,2$ ng.mL^{-1}), glibenclamida ($218,5 \pm 67,1$ ng.mL^{-1}), gliclazida ($1364,0 \pm 49,5$ ng.mL^{-1}), glimepirida ($269,5 \pm 37,5$ ng.mL^{-1}), metformina ($1006,5 \pm 210,0$ ng.mL^{-1}), nateglinida ($4184,2 \pm 420,0$ ng.mL^{-1}), pioglitazona ($1416,0 \pm 271,5$ ng.mL^{-1}) e vildagliptina ($402,5 \pm 122,3$ ng.mL^{-1}). Estes valores estão de acordo com os resultados relatados na literatura (CHENG; CHOU, 2001; NIOPAS; DAFTSIOS, 2002; CHEN et al., 2004; MISTRÌ et al., 2007; SOURÌ et al., 2008; JAGADEESH et al., 2013; POLAGANI et al., 2013; PONTAROLO et al., 2014; EZZELDIN et al., 2014; MANITPISITKUL et al., 2014; CHOI et al., 2015; MACHA et al., 2015).

Frente aos resultados obtidos, o novo método demonstrou ser apto a quantificar diferentes antidiabéticos orais em amostras reais (plasma humano), podendo ser utilizado como uma ferramenta para o monitoramento terapêutico ou estudos farmacocinéticos de pacientes diabéticos.

10. CONCLUSÃO

O método por CLUE-EM desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação simultânea de clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, nateglinida, pioglitazona, rosiglitazona e vildagliptina. Além disso, representa o primeiro método que contempla as cinco principais classes farmacológicas do tratamento de diabetes e que utiliza a técnica analítica a cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, com analisador do tipo quadrupolo tempo-de-vôo. O método desenvolvido com esta técnica se mostrou rápido (tempo de corrida) e com baixo consumo de solvente orgânico.

Os parâmetros de validação demonstraram que o método é sensível, seletivo, linear, preciso, exato e isento de efeito residual e de efeito matriz. Além disso, os analitos se apresentaram estáveis em todas as condições testadas, tanto em matriz quanto em solução.

A precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico proporcionou recuperação reprodutível e satisfatória para os compostos de interesse, além de ser um método simples e rápido quando comparado aos demais métodos de preparação de amostra.

Perante os resultados obtidos, pode-se afirmar que o novo método pode ser utilizado como uma ferramenta no auxílio do tratamento de pacientes diabéticos que façam uso de algum dos medicamentos foco desse trabalho, visto permitir a quantificação de diferentes terapias farmacológicas através de um único método bioanalítico.

11. REFERÊNCIAS

AACE/ACE. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology - Clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan- 2015. **Endocrine Practice**, v. 21, n. 1, 2015.

ABURUZ, S.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimiperide in plasma. **Journal of chromatography. B**, v. 817, p. 277–86, 2005.

ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 34 Suppl 1, p. S62–9, 2011.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. S1–S2, 2015.

AGRAWAL, Y.; GOGOI, P.; MANNA, K.; BHATT, H.; JAIN, V. A supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of metformin and gliclazide in human plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 72, n. 1, p. 50–57, 2010.

ALBARRÁN, O. G.; AMPUDIA-BLASCO, F. J. Dapagliflozin, the first SGLT-2 inhibitor in the treatment of type 2 diabetes. **Medicina clínica**, v. 141, n. 2, p. 36–43, 2013.

ANDÚJAR-PLATA, P.; PI SUNYER, X.; LAFERRÈRE, B. Metformin effects revisited. **Diabetes research and clinical practice**, v. 95, p. 1–9, 2012.

ANTUNA-PUENTE, B.; DISSE, E.; RABASA-LHORET, R.; et al. How can we measure insulin sensitivity/resistance? **Diabetes & metabolism**, v. 37, p. 179–88, 2011.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of chromatography. B**, v. 877, p. 2224–34, 2009.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, p. 1160–71, 2012.

ATALLAH, A. N.; CASTRO, A. A. Revisão Sistemática da Literatura e Metanálise: a melhor forma de evidência para tomada de decisão em saúde e a maneira mais rápida de atualização terapêutica. . p.01–20, 2005.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, p. 69–82, 2014.

ATTIMARAD, M. V; NAIR, A. B.; ALDHUBAIB, B. E. Development of liquid chromatographic method for the simultaneous determination of metformin and miglitol in human plasma: application to pharmacokinetic studies. **Journal Iranian Chemical Society**, 2015.

B, J. OF C. Requirements for initial assay validation and publication in J. Chromatography B. **Journal of Chromatography B**, v. 707, n. 1-2, p. 1–2, 1998.

BAILEY, T. Options for Combination Therapy in Type 2 Diabetes : Comparison of the ADA / EASD Position Statement and AACE / ACE Algorithm. **The American Journal of Medicine**, v. 126, n. 9, p. S10–S20, 2013.

BARRETT, T. Type 2 diabetes mellitus: incidence, management and prognosis. **Pediatric and Child Health**, v. 23, n. 4, p. 163–167, 2013.

BAUER, S.; STÖRMER, E.; KIRCHHEINER, J.; et al. Rapid and simple method for the analysis of nateglinide in human plasma using HPLC analysis with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 551–555, 2003.

BEN-HANDER, G. M.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B.; SALEH, M. I.; CHENG, K. W. Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids. **Talanta**, v. 131, p. 590–6, 2015.

BINZ, T. M.; VILLANI, N.; NEELS, H.; SCHNEIDER, S. Rapid extraction, identification and quantification of oral hypoglycaemic drugs in serum and hair using LC-MS/MS. **Forensic science international**, v. 223, p. 119–24, 2012.

BLAHOVÁ, E.; BRANDŠTETEROVÁ, E. Approaches in Sample Handling before HPLC Analysis of Complex Matrices. **Chem Pap**, v. 58, n. 5, p. 362–373, 2004.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. 2003.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. , v. 2, n. 5, p. 1–899, 2010.

BRASIL. **Resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012**. 2012.

BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B.; CHABNER, B. **Goodman & Gilman's- The Pharmacological Basis of Therapeutics -12 ed**. 2012.

BUDDE, K.; NEUMAYER, H.; FRITSCH, L.; et al. The pharmacokinetics of pioglitazone in patients with impaired renal function. **J Clin Pharmacol**, v. 55, p. 368–374, 2003.

CABO-CALVET, E.; ORTIZ-BOLSICO, C.; BAEZA-BAEZA, J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. Description of the Retention and Peak Profile for Chromolith Columns in Isocratic and Gradient Elution Using Mobile Phase Composition and Flow Rate as Factors. **Chromatography**, v. 1, n. 4, p. 194–210, 2014.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 403–407, 2014.

CAPEAU, J. Insulin resistance and steatosis in humans. **Diabetes & metabolism**, v. 34, p. 649–57, 2008.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CASTRO, A. A. Revisão Sistemática e Meta-análise. **Metodologia**. v. 3, p.1–11, 2001.

CHEN, L.; ZHOU, Z.; SHEN, M.; MA, A. Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Study of Metformin and Rosiglitazone in Human Plasma by HPLC – ESI-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 94–100, 2011.

CHEN, X.; GU, Q.; QIU, F.; ZHONG, D. Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry method, v. 802, p. 377–381, 2004.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of chromatography. A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191–219, 2008.

CHENG, C.; CHOU, C. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. , v. 762, p. 51–58, 2001.

CHERNUSHEVICH, I. V; LOBODA, A. V; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, p. 849–865, 2001.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da Cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de composto tóxicos em alimentos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHO, N. H. Gestational diabetes mellitus — Challenges in research and management. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 2, p. 237–239, 2013.

CHOI, H.-K.; OH, M.; KIM, E. J.; et al. Pharmacokinetic study of metformin to compare voglibose/metformin fixed-dose combination with coadministered voglibose and metformin. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 53, n. 2, p. 147–53, 2015.

CORREIA, L. G.; MANUEL, J. B.; ALMEIDA, J. P. F.; et al. **Diabetes Factos e Números 2012- Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes**. 2012.

DASS, C. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. 2007.

DAVIDSON, M. B.; CALIFORNIA, M. D.; PETERS, A. L. An Overview of Metformin in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 102, n. 1, p. 99–110, 1997.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.

DELL'AGLIO, D. M.; PERINO, L. J.; KAZZI, Z.; et al. Acute Metformin Overdose: Examining Serum pH, Lactate Level, and Metformin Concentrations in Survivors Versus Nonsurvivors: A Systematic Review of the Literature. **Annals of Emergency Medicine**, v. 54, n. 6, p. 818–823, 2009.

DING, C.-G.; ZHOU, Z.; GE, Q.-H.; ZHI, X.-J.; MA, L.-L. Simultaneous determination of metformin and glipizide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical chromatography**, v. 22, n. January, p. 1130–1136, 2007.

DUEZ, H.; CARIOU, B.; STAELS, B. DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. **Biochemical pharmacology**, v. 83, p. 823–32, 2012.

DÜFER, M.; NOACK, K.; EDALAT, A.; KRIPPEIT-DREWS, P.; DREWS, G. Glitazones exert multiple effects on β -cell stimulus-secretion coupling. **Molecular pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 51–60, 2013.

EECKHAUT, A. VAN; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of chromatography. B**, v. 877, p. 2198–207, 2009.

EMA. **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011.

EURACHEM. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2014.

EZZELDIN, E.; ABO-TALIB, N. F.; TAMMAM, M. H.; SHAHAT, A. A. Development and validation of LC/MS/MS method for the simultaneous determination of montelukast, gliclazide, and nifedipine and its application to a pharmacokinetic study. **Chemistry Central journal**, v. 8, n. 1, p. 17, 2014.

FDA. Validation of chromatographic methods. **Pharmaceutical Technology**, , n. 3, p. 104–119, 1994.

FDA. Guidance for industry. Bioanalytical method validation. September, 2001.

FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. 2013.

FRID, A.; STERNER, G. N.; LONDAHL, M.; et al. Novel Assay of Metformin Levels in Patients With Type 2 Diabetes and Varying Levels of Renal Function. **Diabetes care**, v. 33, n. 6, p. 5–7, 2010.

FULOP, T.; LARBI, A.; DOUZIECH, N. Insulin receptor and ageing. **Pathologie Biologie**, v. 51, p. 574–580, 2003.

GARCÍA-PÉREZ, L.-E.; ALVAREZ, M.; DILLA, T.; GIL-GUILLÉN, V.; OROZCO-BELTRÁN, D. Adherence to therapies in patients with type 2 diabetes. **Diabetes therapy**, v. 4, n. 2, p. 175–94, 2013.

GEDEON, C.; KAPUR, B.; ALEKSA, K.; KOREN, G. A simple and rapid HPLC method for the detection of glyburide in plasma original research communication (analytical). **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 167–173, 2008.

GEORGITA, C.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. **Journal of chromatography. B**, v. 854, n. 1-2, p. 211–8, 2007.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 140–50, 2003.

GOMES, M. DE B. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 271–280, 2006.

GONZALEZ, O.; ALONSO, R. M.; FERREIROS, N.; et al. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 3-4, p. 243–252, 2011

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M. E.; IRIARTE, G.; et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of chromatography A**, p. 1–18, 2014.

GREEN, S.; HIGGINS, J. P. T. The Cochrane Collaboration. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0. .

HAN, D.-E.; ZHENG, Y.; LI, N.; et al. Determination of Nateglinide in Human Plasma by LC-ESI-MS and Its Application to Bioequivalence Study. **Chromatographia**, v. 71, n. 3-4, p. 299–304, 2009.

HANSEN, S. H.; BJERGAARD, S. P. **Bioanalysis of Pharmaceuticals- Sample preparation, separation techniques and Mass Spectrometry**. 2015.

HE, J.; HU, Y. F.; DUAN, L. F.; et al. Sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 2, p. 580–5, 2007.

HE, Y.-L.; SABO, R.; PICARD, F.; et al. Study of the pharmacokinetic interaction of vildagliptin and metformin in patients with type 2 diabetes. **Current medical research and opinion**, v. 25, n. 5, p. 1265–72, 2009.

HE, Y.-L.; WANG, Y.; BULLOCK, J. M.; et al. Pharmacodynamics of vildagliptin in patients with type 2 diabetes during OGTT. **Journal of clinical pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 633–41, 2007.

HEFNAWY, M. M.; SULTAN, M. A.; AL-JOHAR, H. I.; KASSEM, M. G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Multi-objective optimization strategy based on desirability functions used for electrophoretic separation and quantification of rosiglitazone and glimepiride in plasma and formulations. **Drug testing and analysis**, v. 4, n. 1, p. 39–47, 2012.

HENNION, M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 856, n. 3, p. 3–54, 1999.

HESS, C.; MUSSHOF, F.; MADEA, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 1, p. 33–41, 2011.

HOIZEY, G.; LAMIABLE, D.; TRENQUE, T.; et al. Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry and library searching. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1666–1672, 2005.

HOLCAPEK, M.; KOLÁROVÁ, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 1, p. 59–78, 2008.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 22, p. 195–214, 2003.

HU, P.; YIN, Q.; DECKERT, F.; et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy Chinese volunteers. **Journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 39–49, 2009.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. 2005.

IDF. **Global Guideline for Type 2 Diabetes**. 2012.

IDF. **IDF Diabetes Atlas seventh edition**. 2015.

IDF/SBD. **Atlas do Diabetes 2014 - Atualização**. 2014.

INZUCCHI, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BUSE, J. B.; et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes A Patient-Centered Approach.PDF. **Diabetes care**, v. 35, p. 1364–1375, 2012.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology- Gold Book**. 2014.

J.-M. M. Diabète : quand la FDA fait marche arrière. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2014, n. 461, p. 14, Apr. 2014.

JAGADEESH, B.; BHARATHI, D. V.; PANKAJ, C.; NARAYANA, V. S.; VENKATESWARULU, V. Development and validation of highly selective and robust method for simultaneous estimation of pioglitazone, hydroxypioglitazone and metformin in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study. **Journal of chromatography. B**, v. 930, p. 136–45, 2013.

JINGAR, J. N.; RAJPUT, S. J.; DASANDI, B.; RATHNAM, S. Development and Validation of LC-UV for Simultaneous Estimation of Rosiglitazone and Glimepride in Human Plasma. , , n. 11, p. 951–955, 2008.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; PRATO, S. DEL. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, p. 1068–83, 2014.

KANG, J. S.; LEE, M. H. Overview of Therapeutic Drug monitoring. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2009.

KARRA, V. K.; PILLI, N. R.; MADDELA, R.; et al. A novel liquid chromatography – tandem mass spectrometric assay for nateglinide in human plasma and its

pharmacokinetic application. **American Journal of Pharmtech Research**, v. 4, n. 5, 2014.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

KAWAGUCHI-SUZUKI, M.; BRIL, F.; SANCHEZ, P. P.; CUSI, K.; FRYE, R. F. A validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of pioglitazone, hydroxypioglitazone, and ketopioglitazone in human plasma and its application to a clinical study. **Journal of chromatography. B**, v. 969, p. 219–23, 2014. Elsevier B.V.

KHAN, G. H.; AQIL, M.; PILLAI, K. K.; et al. Therapeutic adherence: A prospective drug utilization study of oral hypoglycemic in patients with type 2 diabetes mellitus. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 1, p. 347–352, 2014.

KHAN, K. S.; KUNZ, R.; KLEIJNEN, J.; ANTES, G. Five steps to conducting a systematic review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 96, n. 3, p. 118–121, 2003.

KIM, H.; YUN, M.; KWON, K. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterization of Gliclazide in Healthy Volunteers. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 7, p. 564–568, 2003.

KLIMCZAK, I.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food chemistry**, v. 175, p. 100–5, 2015.

KORFMACHER, W. A. Foundation review : Principles and applications of LC – MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1357–1367, 2005.

KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T.; AURIOLA, S. Liquid chromatography/ atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of mass spectrometry**, v. 38, n. 4, p. 357–72, 2003.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29–44, 2015.

KSHIRSAGAR, A. D.; AGGARWAL, A. S.; HARLE, U. N.; DESHPANDE, A. D. DPP IV inhibitors: successes, failures and future prospects. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 5, p. 105–112, 2011.

LAAR, F. A. VAN; LUCASSEN, P. L.; AKKERMANS, R. P.; et al. Alfa-glucosidase Inhibitors for Patients with Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 166–175, 2005.

LAITINEN, H. A. History of analytical chemistry in the U.S.A. **Talanta**, v. 36, n. 1-2, p. 1–9, 1989.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEAHY, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Archives of medical research**, v. 36, p. 197–209, 2005.

LEE, M. J.; MONTE, S.; SANDERSON, J.; HASKINS, N. J. A Preliminary Study Using Fast Gradient Liquid Chromatography Coupled to a Quadrupole Orthogonal Time-of-flight Mass Spectrometer. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 13, p. 216–221, 1999.

LETENDRE, P. W.; CARLSON, J. D.; SEIFERT, R. D.; JR, A. J. D.; DIMMIT, D. Effect of Sucralfate Pharmacokinetics on the Absorption of Chlorpropamide. **J Clin Pharmacol**, v. 26, p. 622–625, 1986.

LI, N.; DENG, Y.; QIN, F.; YU, J.; LI, F. Simultaneous quantification of metformin and glipizide in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 27, n. 2, p. 191–6, 2013.

LIM, C.-K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 5, p. 547–57, 2002.

LIN, K.; LLOYD-JONES, D. M.; LI, D.; CARR, J. C. Quantitative imaging biomarkers for the evaluation of cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 28, n. 2, p. 234–242, 2014.

LIN, Z. J.; DESAI-KRIEGER, D.; SHUM, L. Simultaneous determination of glipizide and rosiglitazone unbound drug concentrations in plasma by equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 265–272, 2004.

LUPI, R.; PRATO, S. DEL. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. **Diabetes & metabolism**, v. 34, p. S56–64, 2008.

MA, S.; ZHU, M. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. **Chemico-biological interactions**, v. 179, n. 1, p. 25–37, 2009.

MACHA, S.; MATTHEUS, M.; PINNETTI, S.; BROEDL, U. C.; WOERLE, H. J. Pharmacokinetics of Empagliflozin and Pioglitazone After Coadministration in Healthy Volunteers. **Clinical therapeutics**, v. 37, n. 7, p. 1503–1516, 2015.

MAGNI, F.; MARAZZINI, L.; PEREIRA, S.; MONTI, L.; GALLI KIENLE, M. Identification of sulfonylureas in serum by electrospray mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 136–141, 2000.

MAIER, V.; ZNALEZIONA, J.; JIROVSKÝ, D.; et al. Determination of antihyperglycemic drugs in nanomolar concentration levels by micellar electrokinetic chromatography with non-ionic surfactant. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 20, p. 4492–8, 2009.

MALDANER, L.; SALES, C.; JARDIM, F. O estado da arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Quím. Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MALETKOVIC, J.; DREXLER, A. Diabetic Ketoacidosis and Hyperglycemic Hyperosmolar State. **Endocrinology and Metabolism Clinics of NA**, v. 42, n. 4, p. 677–695, 2013.

MALLI, D.; GIKAS, E.; VAVAGIANNIS, A.; et al. Determination of nateglinide in human plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization using a coumarin-type fluorescent reagent. **Analytica chimica acta**, v. 599, n. 1, p. 143–50, 2007.

MANITPISITKUL, P.; CURTIN, C. R.; SHALAYDA, K.; et al. Pharmacokinetic interactions between topiramate and pioglitazone and metformin. **Epilepsy Research**, v. 108, n. 9, p. 1519–1532, 2014.

MARASCHIN, J. D. F.; MARUSSI, N.; WITTER, V.; SILVEIRO, S. P. Classificação do diabete melito. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 95, n. 2, p. 1–10, 2010.

MARQUES, M. A S.; SOARES, A. D. S.; PINTO, O. W.; et al. Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies. **Journal of chromatography. B**, v. 852, p. 308–16, 2007.

MATSUKI, M.; MATSUDA, M.; KOHARA, K.; et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride in type 2 diabetic patients: compared effects of once- versus twice-daily dosing. **Endocrine journal**, v. 54, n. 4, p. 571–576, 2007.

MAURER, H. H.; KRATZSCH, C.; KRAEMER, T.; PETERS, F. T.; WEBER, A. A. Screening , library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography –mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 63–73, 2002.

MHLW. **Draft Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development -Japan**. 2013.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; SHRIVASTAV, P. S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p. 97–106, 2007.

MORENO PÉREZ, O.; PICÓ ALFONSO, A.; REVERT MARRAHÍ, P.; MARTÍNEZ FUSTER, S. Glinidas. Revisión de su uso terapéutico en la diabetes mellitus tipo 2. **Endocrinología y Nutrición**, v. 55, n. 2, p. 26–33, 2008.

MOVVA, L. R.; HO, D. K. L.; CORBET, E. F.; LEUNG, W. K. Type-2 diabetes mellitus, metabolic control, serum inflammatory factors, lifestyle, and periodontal status. **Journal of Dental Sciences**, v. 9, p. 1–9, 2014.

NARAHARISETTI, S. B.; KIRBY, B. J.; HEBERT, M. F.; EASTERLING, T. R.; UNADKAT, J. D. Validation of a sensitive LC-MS assay for quantification of glyburide and its metabolite 4-transhydroxy glyburide in plasma and urine: An OPRU Network study. **Journal of Chromatography B**, v. 860, n. 1, p. 34–41, 2007.

NATHAN, D. M.; BUSE, J. B.; DAVIDSON, M. B.; et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes : A Consensus Algorithm. **Diabetes care**, v. 32, n. 1, p. 193–203, 2009.

NGUYEN, D. T.-T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1836–1848, 2006.

NI, X.-J.; WANG, Z.-Z.; SHANG, D.-W.; et al. Simultaneous determination of glimepiride and pioglitazone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Journal of chromatography. B**, v. 960, p. 247–52, 2014.

NIKITAS, P.; PAPPA-LOUISI, A.; PAPACHRISTOS, K. Optimisation technique for stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, n. 2, p. 283–289, 2004.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A. C. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. , v. 28, p. 653–657, 2002.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. **The new England Journal of Medicine**, v. 356, n. 24, p. 2457–2471, 2007.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8–35, 2009.

NWOKIKE, J.; KABORE, L.; STERGACHIS, A. Actions of the National Regulatory Authorities in 10 Low- and Middle-Income Countries Following Stringent Regulatory Authority Safety Alerts on Rosiglitazone. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 49, n. 2, p. 279–283, 2014.

ODUNOLA, M. T. B.; ENEMALI, I. S.; GARBA, M.; OBODOZIE, O. O. Rapid high performance liquid chromatographic determination of chlorpropamide in human plasma. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. June, p. 1378–1381, 2007.

OLIVEIRA, E. C. DE; MULLER, E. I.; ABAD, F.; DALLAROSA, J.; ADRIANO, C. Internal Standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. **Quimica Nova**, v. 33, n. 4, p. 984–987, 2010.

ORLANDO, R. M.; CORDEIRO, D. D.; ELISA, A.; et al. Pré-Tratamento de Amostras. **Vita et Sanitas**, v. 3, p. 122–139, 2009.

OVALLE, F. Cardiovascular implications of antihyperglycemic therapies for type 2 diabetes. **Clinical therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 393–407, 2011.

PETERS, A. F. T.; HARTUNG, M.; SAAR, H.; SCHMITT, M. H. G. **Requirements for the validation of analytical methods**. 2009.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic science international**, v. 165, p. 216–24, 2007.

PINHAS-HAMIEL, O.; ZEITLER, P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **The Lancet**, v. 369, p. 1823–1831, 2007.

POLAGANI, S. R.; PILLI, N. R.; GAJULA, R.; GANDU, V. Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC–MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 1, p. 9–19, 2013.

PONTAROLO, R.; GIMENEZ, A. C.; FRANCISCO, T. M. G. DE; et al. Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method. **Journal of chromatography. B**, v. 965, p. 133–41, 2014.

PUIG-DOMINGO, M.; PELLITERO, S. Nuevos agentes terapéuticos para la diabetes tipo 2: una perspectiva para el siglo. **Medicina clinica**, p. 1–6, 2014. SEGO.

QIU, X.; ZHAO, J.; WANG, Z.; XU, Z.; XU, R. Simultaneous determination of bosentan and glimepiride in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 95, p. 207–12, 2014.

RAGO, M. DI; SAAR, E.; RODDA, L. N.; et al. Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 243, p. 35–43, 2014.

RANETTI, M. C.; IONESCU, M.; HINESCU, L.; et al. Validation of a HPLC method for the simultaneous analysis of metformin and gliclazide in human plasma. **Farmacia**, v. 57, p. 728–735, 2009.

RASHID, A.; AHMAD, M.; MINHAS, M. U.; HASSAN, I. J.; MALIK, M. Z. Pharmacokinetic studies of metformin and glibenclamide in normal human volunteers. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 153–159, 2014.

REDDY, S.; AHMED, I.; AHMAD, I.; MUKHOPADHYAY, A.; THANGAM, S. Development and Validation of a Method for Simultaneous Estimation of Metformin and Sitagliptin in Human Plasma by LC – MS-MS and Its Application in a Bioequivalence Study. **Journal of Chromatographic Science**, , n. 11, p. 1–8, 2015.

RUSSO, R.; GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T.; et al. Pharmaceutical Applications on Columns Packed with Sub-2 μm Particles. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. March, p. 199–208, 2008.

SABIA, H.; SUNKARA, G.; LIGUEROS-SAYLAN, M.; et al. Effect of a selective CYP2C9 inhibitor on the pharmacokinetics of nateglinide in healthy subjects. **European journal of clinical pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 407–12, 2004.

SARKAR, A.; TIWARI, A.; BHASIN, P. S.; MITRA, M. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Gliclazide : A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 01, n. 09, p. 11–19, 2011.

SBD. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2 : Algoritmo SBD 2014. , v. 1, p. 1–27, 2014.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2015.

SBEM. Projeto Diretrizes Diabetes Mellitus : Tratamento Medicamentoso. , p. 1–10, 2004.

SCHEEN, A. J.; PAQUOT, N. Metformin revisited : A critical review of the benefit – risk balance in at-risk patients with type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 179–190, 2013.

SCHELLINGER, A. P.; CARR, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 253–266, 2006.

SENGUPTA, P.; BHAUMIK, U.; GHOSH, A.; et al. LC–MS–MS Development and Validation for Simultaneous Quantitation of Metformin, Glimepiride and

Pioglitazone in Human Plasma and Its Application to a Bioequivalence Study. **Chromatographia**, v. 69, n. 11-12, p. 1243–1250, 2009.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W.; et al. Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 12, p. 1551–7, 2000.

SHANTIKUMAR, S.; SATHEESHKUMAR, N.; PRASANTH, B.; et al. A sensitive and selective liquid chromatography mass spectrometry method for simultaneous estimation of anti-diabetic drugs inhibiting DPP-4 enzyme in human plasma: overcoming challenges associated with low recovery and sensitivity. **Analytical Methods**, v. 7, p. 6198–6206, 2015.

SHIN, K.-H.; KIM, S. E.; YOON, S. H.; et al. Pharmacokinetic comparison of a new sustained-release formulation of glimepiride/metformin 1/500 mg combination tablet and a sustained-release formulation of glimepiride/metformin 2/500 mg combination tablet in healthy Korean male volunteers: a randomized. **Clinical therapeutics**, v. 33, n. 11, p. 1809–18, 2011.

SINGH, R.; KAUR, N.; KISHORE, L.; GUPTA, G. K. Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach \$. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 51–70, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 2002.

SØRENSEN, L. K. Determination of metformin and other biguanides in forensic whole blood samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Biomedical chromatography**, v. 26, n. 1, p. 1–5, 2012.

SOURI, E.; JALALIZADEH, H.; SAREMI, S. Development and validation of a simple and rapid HPLC method for determination of pioglitazone in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. 9, p. 809–812, 2008.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1058, p. 61–66, 2004.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; HAEFTEN, T. W. VAN. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, p. 1333–46, 2005.

TAKAHASHI, A.; NAGASHIMA, K.; HAMASAKI, A.; et al. Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of K(ATP) channels, and accelerate apoptotic beta-cell death in the chronic phase. **Diabetes research and clinical practice**, v. 77, p. 343–50, 2007.

TIRUMALA, R.; LAKSHMI, K. S. Wednesday Poster Sessions Analytical Chemistry. , p. 102–138, 2009.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 25–38, 2010.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57–59, 2011.

USP. **USP 37 (621) Chromatography**. .

VACANTE, M.; MALAGUARNERA, M.; MOTTA, M. Revision of the ADA-classification of diabetes mellitus type 2 (DMT2): the importance of maturity onset diabetes (MOD), and senile diabetes (DS). **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2011.

VAZ, S. Análise Química Instrumental e sua Aplicação em Controle de Qualidade de Biocombustíveis 03. **Embrapa**, 2010.

VIANA, I. M. D. O.; LIMA, P. D. P. R.; SOARES, C. D. V.; FERNANDES, C. Simultaneous determination of oral antidiabetic drugs in human plasma using microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 96, p. 241–8, 2014.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A regulação de Medicamentos no Brasil**. 2013.

WAL, P.; BHANDARI, A.; RAI, A. K. Bioanalytical Method Development – Determination of Drugs in Biological Fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 333–347, 2010.

WANG, Y.; TANG, Y.; GU, J.; FAWCETT, J. P.; BAI, X. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 808, n. 2, p. 215–219, 2004.

WATSON, J. T. **Introduction to Mass Spectrometry**. .

WAUGH, N.; CUMMINS, E.; ROYLE, P.; et al. Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes : systematic review and economic evaluation Executive summary. , v. 14, n. 36, 2010.

WEAVER, M. L.; ORWIG, B. A.; RODRIGUEZ, L. C.; et al. PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF NATEGLINIDE IN HUMANS. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 415–421, 2001.

WHO. **Adherence to long-term therapies**. 2003.

WHO/FAO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. , 2003.

WHO/IDF. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia**. 2006.

WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M. G. Quantitative liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry. **Biomedical chromatography**, v. 21, p. 567–576, 2007.

WU, J.; CHEN, Y.; SHI, X.; GU, W. Dipeptidyl peptidase IV(DPP IV): a novel emerging target for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 4, p. 228–235, 2009.

XUE, Y.-J.; TURNER, K. C.; MEEKER, J. B.; et al. Quantitative determination of pioglitazone in human serum by direct-injection high-performance liquid chromatography mass spectrometry and its application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 795, p. 215–226, 2003.

YARDIMCI, C.; OZALTIN, N.; GÜRLEK, A. Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1416–22, 2007.

ZHANG, A.; QIU, S.; XU, H.; SUN, H.; WANG, X. Metabolomics in diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 429, p. 106–110, 2014.

ZHANG, L.; TIAN, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, Y. Simultaneous determination of metformin and rosiglitazone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 854, n. 1-2, p. 91–98, 2007.

ZHONG, G.-P.; BI, H.-C.; ZHOU, S.; CHEN, X.; HUANG, M. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. **Journal of mass spectrometry**, v. 40, n. 11, p. 1462–1471, 2005.

ZHU, Y.; ZHANG, Q.; YU, C.; et al. Relative fasting bioavailability of two formulations of nateglinide 60 mg in healthy male Chinese volunteers: an open-label, randomized-sequence, single-dose, two-way crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 7, p. 1505–10, 2012.

APÊNDICES

**APÊNDICE 1 — ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NAS
BASES DE DADOS**

PUBMED**#1**

((antidiabetic*[Title/Abstract]) OR anti-diabetic*[Title/Abstract]) OR "antidiabetic agent*" [Title/Abstract]) OR "oral antidiabetic*" [Title/Abstract]) OR "oral anti-diabetic*" [Title/Abstract]) OR "oral antidiabetic agent*" [Title/Abstract]) OR "antidiabetic drug*" [Title/Abstract]) OR "oral antidiabetic drug*" [Title/Abstract]) OR "oral anti-diabetic agent*" [Title/Abstract]) OR "oral anti-diabetic drug*" [Title/Abstract]) OR antihyperglycemic*[Title/Abstract]) OR antihyperglycemic*[Title/Abstract]) OR "antihyperglycemic agent*" [Title/Abstract]) OR "antihyperglycemic drug*" [Title/Abstract]) OR "anti-hyperglycemic agent*" [Title/Abstract]) OR "anti-hyperglycemic drug*" [Title/Abstract]) OR "oral hypoglycemic agent*" [Title/Abstract]) OR "hypoglycemic agent*" [Title/Abstract]) OR "oral hypoglycemic drug*" [Title/Abstract]) OR "hypoglycemic drug*" [Title/Abstract]) OR "antidiabetic medication" [Title/Abstract]) OR "anti-diabetic medication" [Title/Abstract]) OR "oral antidiabetic medication" [Title/Abstract]) OR "oral anti-diabetic medication" [Title/Abstract]) OR biguanide*[Title/Abstract]) OR metformin [Title/Abstract]) OR glucophage [Title/Abstract]) OR thiazolidinedione*[Title/Abstract]) OR glitazone* [Title/Abstract]) OR rosiglitazone [Title/Abstract]) OR avandia [Title/Abstract]) OR pioglitazone [Title/Abstract]) OR actos [Title/Abstract]) OR "insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR sulfonylurea*[Title/Abstract]) OR sulphonylurea*[Title/Abstract]) OR carbutamide [Title/Abstract]) OR acetohexamide [Title/Abstract]) OR dymelor [Title/Abstract]) OR chlorpropamide [Title/Abstract]) OR diabinese [Title/Abstract]) OR tolbutamide [Title/Abstract]) OR orinase [Title/Abstract]) OR rastinon [Title/Abstract]) OR tolazamide [Title/Abstract]) OR tolinase [Title/Abstract]) OR glipizide [Title/Abstract]) OR glucotrol [Title/Abstract]) OR minidiab [Title/Abstract]) OR gilbenese [Title/Abstract]) OR gliclazide [Title/Abstract]) OR "uni diamicon" [Title/Abstract]) OR glibenclamide [Title/Abstract]) OR glyburide [Title/Abstract]) OR micronase [Title/Abstract]) OR diabeta [Title/Abstract]) OR glynase [Title/Abstract]) OR daonil [Title/Abstract]) OR englycon [Title/Abstract]) OR glibornuride [Title/Abstract]) OR gliquidone [Title/Abstract]) OR glurenorm [Title/Abstract]) OR glisoxepide [Title/Abstract]) OR glycropyramide [Title/Abstract]) OR glimepiride [Title/Abstract]) OR amaryl [Title/Abstract]) OR meglitinide*[Title/Abstract]) OR glinidine*[Title/Abstract]) OR

"non-sulfonylurea insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR "nonsulfonylurea
 insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR "non-sulphonylurea insulin
 secretagogue*" [Title/Abstract]) OR "nonsulphonylurea insulin secretagogue*"
 [Title/Abstract]) OR "nonsulfonylurea rapid insulin secretagogue*" [Title/Abstract])
 OR "non-sulfonylurea rapid insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR
 "nonsulphonylurea rapid insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR "non-
 sulphonylurea rapid insulin secretagogue*" [Title/Abstract]) OR "nonsulfonylurea
 drug*" [Title/Abstract]) OR "non-sulfonylurea drug*" [Title/Abstract]) OR
 "nonsulphonylurea drug*" [Title/Abstract]) OR "non-sulphonylurea drug*"
 [Title/Abstract]) OR repaglinide [Title/Abstract]) OR prandin [Title/Abstract]) OR
 novonorm [Title/Abstract]) OR nateglinide [Title/Abstract]) OR starlix
 [Title/Abstract]) OR "alfa-glucosidase inhibitors" [Title/Abstract]) OR "α-
 glucosidade inhibitors" [Title/Abstract]) OR miglitol [Title/Abstract]) OR glyset
 [Title/Abstract]) OR acarbose [Title/Abstract]) OR precose [Title/Abstract]) OR
 glucobay [Title/Abstract]) OR voglibose [Title/Abstract]) OR "dipeptidyl peptidase-
 4 inhibitors" [Title/Abstract]) OR "dipeptydil peptidase-4 inhibitors" [Title/Abstract])
 OR "dipeptidyl peptidase 4" [Title/Abstract]) OR "dipeptydil peptidase 4"
 [Title/Abstract]) OR "dipeptydil peptidase IV" [Title/Abstract]) OR "dipeptidyl
 peptidase IV" [Title/Abstract]) OR vildagliptin [Title/Abstract]) OR galvus
 [Title/Abstract]) OR sitagliptin [Title/Abstract]) OR januvia [Title/Abstract]) OR
 saxagliptin [Title/Abstract]) OR onglyza [Title/Abstract]) OR linagliptin
 [Title/Abstract]) OR tradjenta [Title/Abstract]) OR alogliptin [Title/Abstract]) OR
 nesina [Title/Abstract]) OR vipidia [Title/Abstract]) OR septagliptin [Title/Abstract])
 OR glycosurics [Title/Abstract]) OR canagliflozin [Title/Abstract]) OR invokana
 [Title/Abstract]) OR dapagliflozin [Title/Abstract]) OR forxiga [Title/Abstract]) OR
 antidiabetics [MeSH Terms]) OR "antidiabetic agents" [MeSH Terms]) OR
 "antidiabetic drugs" [MeSH Terms]) OR hypoglycemic agents [MeSH Terms]) OR
 "hypoglycemic drugs" [MeSH Terms]))

#2

(("mass
 spectrometry"
 [Title/Abstract]) OR "tandem mass spectrometry" [Title/Abstract]) OR "mass
 spectrometer" [Title/Abstract]) OR "time of flight" [Title/Abstract]) OR time-of-flight
 [Title/Abstract]) OR TOF [Title/Abstract]) OR quadrupole [Title/Abstract]) OR
 "single quadrupole" [Title/Abstract]) OR "triple quadrupole" [Title/Abstract]) OR

"QqQ" [Title/Abstract]) OR QTOF[Title/Abstract]) OR Q-TOF[Title/Abstract]) OR quadrupole-time-of-flight [Title/Abstract]) OR "quadrupole time-of-flight" [Title/Abstract]) OR quadrupole time of flight[Title/Abstract]) OR ion-trap [Title/Abstract]) OR "ion trap"[Title/Abstract]) OR iontrap[Title/Abstract]) OR orbitrap [Title/Abstract]) OR electrospray[Title/Abstract]) OR "electrospray ionization"[Title/Abstract]) OR APCI[Title/Abstract]) OR "Atmospheric pressure chemical ionization" [Title/Abstract]) OR MS[Title/Abstract]) OR MS-MS [Title/Abstract]) OR MS/MS[Title/Abstract]) OR LC-MS[Title/Abstract]) OR LC/MS [Title/Abstract]) OR GC/MS[Title/Abstract]) OR GC-MS[Title/Abstract]) OR LC-MS/MS [Title/Abstract]) OR LC-MS-MS[Title/Abstract]) OR LC/MS-MS [Title/Abstract]) OR GC-MS/MS[Title/Abstract]) OR GC-MS-MS[Title/Abstract]) OR GC/MS-MS[Title/Abstract]) OR UHPLC-MS[Title/Abstract]) OR UHPLC/MS [Title/Abstract]) OR UPLC-MS[Title/Abstract]) OR UPLC/MS[Title/Abstract]) OR UHPLC-MS/MS[Title/Abstract]) OR UHPLC-MS-MS[Title/Abstract]) OR UPLC-MS/MS[Title/Abstract]) OR UPLC-MS-MS[Title/Abstract]) OR UPLC/MS-MS[Title/Abstract]) OR HILIC-MS[Title/Abstract]) OR HILIC/MS[Title/Abstract]) OR HILIC-MS/MS[Title/Abstract]) OR HILIC-MS-MS[Title/Abstract]) OR HILIC/MS-MS [Title/Abstract]) OR "ultra performance liquid chromatography" [Title/Abstract]) OR "liquid chromatography"[Title/Abstract]) OR "high performance liquid chromatography"[Title/Abstract]) OR UPLC[Title/Abstract]) OR UHPLC [Title/Abstract]) OR HPLC[Title/Abstract]) OR LC[Title/Abstract]) OR chromatography [Title/Abstract]) OR "gas chromatography"[Title/Abstract]) OR GC [Title/Abstract]) OR infrared[Title/Abstract]) OR infra-red[Title/Abstract]) OR UV[Title/Abstract]) OR ultraviolet[Title/Abstract]) OR ultra-violet[Title/Abstract]) OR "ultra violet"[Title/Abstract]) OR DAD[Title/Abstract]) OR fluorescence [Title/Abstract]) OR electrophoresis [Title/Abstract]) OR "diode array detector"[Title/Abstract]) OR "diode-array detector"[Title/Abstract]) OR "electrophoresis capillary"[Title/Abstract]) OR mass spectrometry[MeSH Terms]) OR analyses, mass spectrum [MeSH Terms]) OR chromatography mass spectrometry, gas liquid[MeSH Terms]) OR tandem mass spectrometry[MeSH Terms]) OR spectrometry, mass, electrospray ionization[MeSH Terms]) OR spectrometry, mass[MeSH Terms]) OR ESI mass spectrometry[MeSH Terms]) OR chromatography[MeSH Terms]) OR chromatography, gas liquid[MeSH Terms]

#3

((((((((((validation[Title/Abstract]) OR development[Title/Abstract]) OR determination [Title/Abstract]) OR quantification[Title/Abstract]) OR quantitation [Title/Abstract]) OR simultaneous[Title/Abstract]) OR quantitative[Title/Abstract]) OR "simultaneous quantitative"[Title/Abstract]) OR method[Title/Abstract]) OR detection [Title/Abstract]) OR identification[Title/Abstract]) OR assay [Title/Abstract]

#4 (((plasma[Title/Abstract]) OR "human plasma"[Title/Abstract]) OR blood [Title/Abstract]) OR serum[Title/Abstract]

WEB OS SCIENCE

(antidiabetic* OR anti-diabetic* OR "antidiabetic agent*" OR "oral antidiabetic*" OR "oral anti-diabetic*" OR "oral antidiabetic agent*" OR "antidiabetic drug*" OR "oral antidiabetic drug*" OR "oral anti-diabetic agent*" OR "oral anti-diabetic drug*" OR antihyperglycemic* OR anti-hyperglycemic* OR "antihyperglycemic agent*" OR "antihyperglycemic drug*" OR "anti-hyperglycemic agent*" OR "anti-hyperglycemic drug*" OR "oral hypoglycemic agent*" OR "hypoglycemic agent*" OR "oral hypoglycemic drug*" OR "hypoglycemic drug*" OR "antidiabetic medication" OR "anti-diabetic medication" OR "oral antidiabetic medication" OR "oral anti-diabetic medication" OR biguanide* OR metformin OR glucophage OR thiazolidinedione* OR glitazone* OR rosiglitazone OR avandia OR pioglitazone OR actos OR "insulin ecretagogue*" OR sulfonylurea* OR sulphonylurea* OR carbutamide OR acetohexamide OR dymelor OR chlorpropamide OR diabinese OR tolbutamide OR orinase OR rastinon OR tolazamide OR tolinase OR glipizide OR glucotrol OR minidiab OR gilbenese OR gliclazide OR "uni diamicon" OR glibenclamide OR glyburide OR micronase OR diabeta OR glynase OR daonil OR englycon OR glibornuride OR gliquidone OR glurenorm OR glisoxepide OR glycopyramide OR glimepiride OR amaryl OR meglitinide* OR glinidine* OR "non-sulfonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea insulin secretagogue*" OR "non-sulphonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulphonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "non-sulfonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "nonsulphonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "non-sulphonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea drug*" OR "non-sulfonylurea drug*"

OR "nonsulphonylurea drug*" OR "non-sulphonylurea drug*" OR repaglinide OR prandin OR novonorm OR nateglinide OR starlix OR "alfa-glucosidase inhibitors" OR "α-glucosidase inhibitors" OR miglitol OR glyset OR acarbose OR precose OR glucobay OR voglibose OR "dipeptidyl peptidase-4 inhibitors" OR "dipeptidyl peptidase-4 inhibitors" OR "dipeptidyl peptidase 4" OR "dipeptidyl peptidase 4" OR "dipeptidyl peptidase IV" OR "dipeptidyl peptidase IV" OR vildagliptin OR galvus OR sitagliptin OR januvia OR saxagliptin OR onglyza OR linagliptin OR tradjenta OR alogliptin OR nesina OR vipidia OR sepragliptin OR glycosurics OR canagliflozin OR invokana OR dapagliflozin OR forxiga) AND Tópico: ("mass spectrometry" OR "tandem mass spectrometry" OR "mass spectrometer" OR "time of flight" OR time-of-flight OR tof OR quadrupole OR "single quadrupole" OR "triple quadrupole" OR QqQ OR qtof OR q-tof OR quadrupole-time-of-flight OR "quadrupole time-of-flight" OR "quadrupole time of flight" OR ion-trap OR "ion trap" OR iontrap OR orbitrap OR electrospray OR esi OR "electrospray ionization" OR apci OR "Atmospheric pressure chemical ionization" OR ms OR ms-ms OR ms/ms OR lc-ms OR lc/ms OR gc-ms OR gc/ms OR lc-ms/ms OR lc-ms-ms OR lc/ms-ms OR gc-ms/ms OR gc-ms-ms OR gc/ms-ms OR uhplc-ms OR uhplc/ms OR uhplc-ms/ms OR uhplc-ms-ms OR uhplc/ms-ms OR uplc-ms OR uplc/ms OR uplc-ms/ms OR uplc-ms-ms OR uplc/ms-ms OR hilic-ms OR hilic/ms OR hilic-ms/ms OR hilic-ms-ms OR hilic/ms-ms OR "ultra performance liquid chromatography" OR liquid chromatography OR uplc OR uhplc OR hplc OR "high performance liquid chromatography" OR liquid chromatography OR lc OR chromatography OR "gas chromatography" gc OR uv OR ultraviolet OR desi OR "desorption electrospray ionization") AND Tópico:(validation OR development OR determination OR quantification OR simultaneous OR quantitative OR simultaneous quantitative OR method OR detection OR identification OR quantitation OR assay) AND Tópico:(plasma OR human plasma OR blood OR serum)

SCOPUS

(TITLE-ABS-KEY (antidiabetic* OR anti-diabetic* OR "antidiabetic agent*" OR "oral antidiabetic*" OR "oral anti-diabetic*" OR "oral antidiabetic agent*" OR "antidiabetic drug*" OR "oral antidiabetic drug*" OR "oral anti-diabetic agent*" OR "oral anti-diabetic drug*" OR antihyperglycemic* OR anti-

hyperglycemic* OR "antihyperglycemic agent*" OR "antihyperglycemic drug*" OR "anti-hyperglycemic agent*" OR "anti-hyperglycemic drug*" OR "oral hypoglycemic agent*" OR "hypoglycemic agent*" OR "oral hypoglycemic drug*" OR "hypoglycemic drug*" OR "antidiabetic medication" OR "anti-diabetic medication" OR "oral antidiabetic medication" OR "oral anti-diabetic medication" OR biguanide* OR metformin OR glucophage OR thiazolidinedione* OR glitazone* OR rosiglitazone OR avandia OR pioglitazone OR actos OR "insulin ecretagogue*" OR sulfonylurea* OR sulphonylurea* OR carbutamide OR acetohexamide OR dymelor OR chlorpropamide OR diabinese OR tolbutamide OR orinase OR rastinon OR tolazamide OR tolinase OR glipizide OR glucotrol OR minidiab OR gilbenese OR gliclazide OR "uni diamicon" OR glibenclamide OR glyburide OR micronase OR diabeta OR glynase OR daonil OR englycon OR glibornuride OR gliquidone OR glurenorm OR glisozepide OR glycopyramide OR glimepiride OR amaryl OR meglitinide* OR glinidine* OR "non-sulfonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea insulin secretagogue*" OR "non-sulphonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulphonylurea insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "non-sulphonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "nonsulphonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "non-sulphonylurea rapid insulin secretagogue*" OR "nonsulfonylurea drug*" OR "non-sulfonylurea drug*" OR "nonsulphonylurea drug*" OR "non-sulphonylurea drug*" OR repaglinide OR prandin OR novonorm OR nateglinide OR starlix OR "alfa-glucosidase inhibitors" OR "α-glucosidase inhibitors" OR miglitol OR glyset OR acarbose OR precose OR glucobay OR voglibose OR "dipeptidyl peptidase-4 inhibitors" OR "dipeptidyl peptidase-4 inhibitors" OR "dipeptidyl peptidase 4" OR "dipeptidyl peptidase 4" OR "dipeptidyl peptidase IV" OR "dipeptidyl peptidase IV" OR vildagliptin OR galvus OR sitagliptin OR januvia OR saxagliptin OR onglyza OR linagliptin OR tradjenta OR alogliptin OR nesina OR vipidia OR septagliptin OR glycosurics OR canagliflozin OR invokana OR dapagliflozin OR forxiga) AND TITLE-ABS-KEY ("mass spectrometry" OR "tandem mass spectrometry" OR "mass spectrometer" OR "time of flight" OR time-of-flight OR tof OR quadrupole OR "single quadrupole" OR "triple quadrupole" OR qqq OR qt of OR q-tof OR quadrupole-time-of-flight OR "quadrupole time-of-flight" OR

"quadrupole time of flight" OR ion-trap OR "ion trap" OR iontrap OR orbitrap OR electrospray OR esi OR "electrospray ionization" OR apci OR "Atmospheric pressure chemical ionization" OR ms OR ms-ms OR ms/ms OR lc-ms OR lc/ms OR gc-ms OR gc/ms OR lc-ms/ms OR lc-ms-ms OR lc/ms-ms OR gc-ms/ms OR gc-ms-ms OR gc/ms-ms OR uhplc-ms OR uhplc/ms OR uhplc-ms/ms OR uhplc-ms-ms OR uhplc/ms-ms OR upcl-ms OR uplc/ms OR uplc-ms/ms OR uplc-ms-ms OR uplc/ms-ms OR hilic-ms OR hilic/ms OR hilic-ms/ms OR hilic-ms-ms OR hilic/ms-ms OR "ultra performance liquid chromatography" OR liquid chromatography OR uplc OR uhplc OR hplc OR "high performance liquid chromatography" OR liquid chromatography OR lc OR chromatography OR "gas chromatography" gc OR uv OR ultraviolet OR desi OR "desorption electrospray ionization") AND TITLE-ABS-KEY (validation OR development OR determination OR quantification OR simultaneous OR quantitative OR simultaneous quantitative OR method OR detection OR identification OR quantitation OR assay) AND TITLE-ABS-KEY (plasma OR human plasma OR blood OR serum))

APÊNDICE 2 - TABELAS PARA EXTRAÇÃO DE DADOS

