

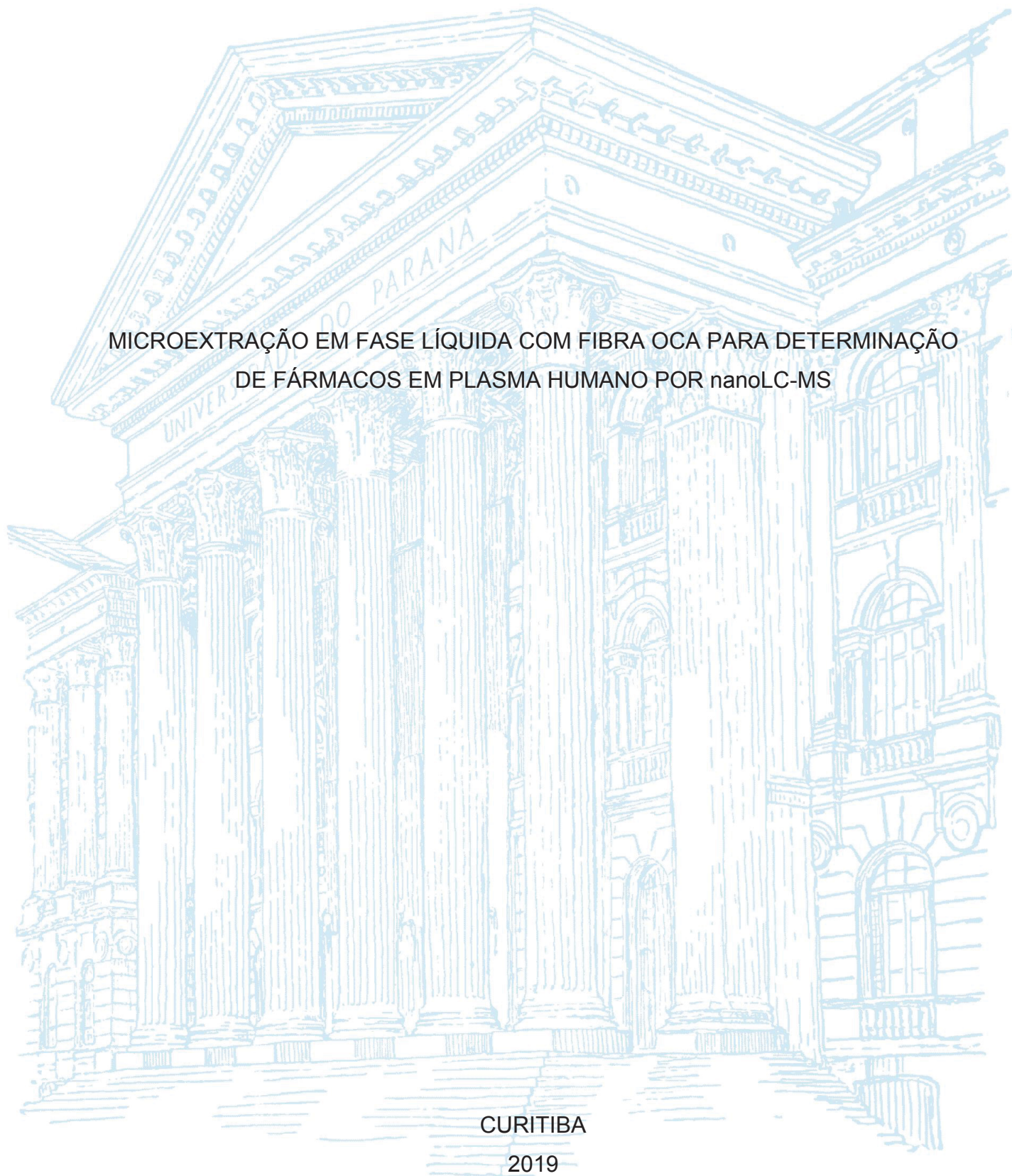
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ ISABELLA CESTARO

MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA PARA DETERMINAÇÃO
DE FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO POR nanoLC-MS

CURITIBA

2019



BEATRIZ ISABELLA CESTARO

MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA PARA DETERMINAÇÃO
DE FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO POR nanoLC-MS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

Coorientador: Dr. Michel Batista

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C422m Cestaro, Beatriz Isabella

Microextração em fase líquida com fibra oca para determinação de fármacos em plasma humano por nanoLC-MS [recurso eletrônico] / Beatriz Isabella Cestaro, 2019.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Coorientador: Dr. Michel Batista

1. Fármacos. 2. Farmacologia. I. Universidade Federal do Paraná. II. Silva, Bruno José Gonçalves da. III. Batista, Michel. IV. Título.

CDD 615



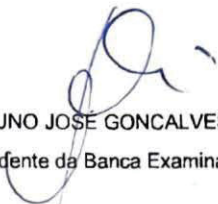
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2


TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BEATRIZ ISABELLA CESTARO** intitulada: **Microextração em fase líquida com fibra oca para determinação de fármacos em plasma humano por nanoLC-MS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2019.


BRUNO JOSÉ GONCALVES DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARCUS VINICIUS DE LIZ
Avaliador Externo (UTFPR)


GILBERTO ABATE
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva, pela orientação, confiança, paciência, ensinamentos e olhar otimista ao encontrarmos pedrinhas no percurso.

Ao Dr. Michel Batista, por me aceitar como estagiária anos atrás e pela colaboração nestes últimos anos. Pela disponibilização do Orbitrap e toda ajuda com o equipamento.

Aos professores que compuseram as bancas de avaliação da qualificação, Prof^a Dr^a Andrea Pinto de Oliveira e Prof^a Dr^a Francinete Ramos Campos, e da defesa, Prof. Dr. Gilberto Abate e Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz, pela valiosas contribuições a este trabalho.

Ao Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFPR, em especial a Prof^a. Dr^a. Aline Borsato Hauser pela colaboração com esta pesquisa.

Ao Prof. Dr Patricio G. Peralta-Zamora, por ceder os padrões analíticos deste trabalho.

Aos amigos do GQA e Tecnotrater, pela convivência, companheirismo e colaboração.

Às meninas do CroMe, pelo apoio nestes dois anos, companhia nas disciplinas, conversas, risadas e ouvirem meus desabafos.

Aos meus amigos, Karin, Ana Carolina, Andreza, Ana Brum, Rafael, Ana Preidum, Jéssica, Kelly, Simone, Carmen, Carolina, Cintia, Francielle, Grazielle, Luana, Monize, Raquel e Thatiane, por serem meu sistema de apoio há tantos anos e nunca falharem na missão.

À Tia Raquel, pelo envolvimento especial com a pesquisa nestes últimos meses.

À toda a minha família, por todo o amor e amparo em toda minha vida, por se mobilizarem para me ajudar e me darem comida nas horas de mau humor.

Aos meus pais, por me fazerem acreditar que não há limites do que eu poderia realizar, paciência com meu mau humor e pelas infinitas caronas, principalmente às 7h da manhã no domingo, rumo ao CIC.

Às minhas irmãs, por serem meus exemplos, por sempre estarem do meu lado e virem ao meu auxílio quando encontrei dificuldades.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

RESUMO

A determinação de fármacos em amostras biológicas, como plasma humano, pode ser feita com diferentes propósitos, dentre os quais cabe-se destacar o monitoramento terapêutico de fármacos e toxicologia forense. No entanto, devido à complexidade da matriz e à ligação de fármacos a proteínas, a etapa de preparo de amostra pode se tornar desafiadora. A microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) é uma técnica de preparo de amostra de baixo custo, que faz uso de quantidades mínimas de solventes orgânicos e apresenta excelente eficiência de *clean-up* e fatores de pré-concentração. Unida a nanocromatografia acoplada a espectrometria de massas (nanoLC-MS), que fornece análises de alta eficiência e detectabilidade, juntamente a identificação confiável dos analitos, as técnicas se tornam ideais para matrizes biológicas. Neste presente trabalho foi realizado o desenvolvimento de um método analítico para determinação de cinco fármacos em plasma humano empregando HF-LPME e nanoLC-MS. A separação cromatográfica dos cinco fármacos foi atingida fazendo uso de um gradiente 15 min, no qual a proporção acetonitrila:água varia de 30:70 à 100:0 (v/v), utilizando ácido fórmico 0,10% (v/v) como aditivo na fase móvel. O monitoramento dos fármacos foi realizado pelo modo *fullscan*, tanto para os íons precursores quanto para os íons produto. A extração fez uso de 250 µL de plasma humano, os quais foram posteriormente avolumados a 10,0 mL com 10% de cloreto de sódio (m/v), 5% de metanol (v/v) em hidróxido de amônio (pH 10) como fase doadora. As demais condições de compromisso da HF-LPME são 20 µL de 1-octanol como fase aceptora, agitação de 750 rpm e tempo de extração de 30 min. Por fazer uso de ferramentas de identificação dos analitos, como massa exata, perfil isotópico e perfil de fragmentação, o método desenvolvido pode ser empregado com seletividade e especificidade em análises de *screening* para a carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em concentrações tão baixas quanto 20 ng mL⁻¹. Visando a aplicação do método para quantificação dos fármacos em amostras de plasma humano, foi observada linearidade satisfatória para carbamazepina, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima, nas faixas de 0,06-2,5, 0,02-1,5, 0,25-2,5 e 0,02-2,5 µg mL⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, foram observadas precisão e exatidão adequadas para o método, inferiores a ±15,0%, assim como limites inferiores de quantificação na faixa de 0,02 a 0,25 µg mL⁻¹ e taxas de recuperação na faixa de 3,00 a 95,4%. Dessa forma, o método analítico desenvolvido pode ser empregado com seletividade, especificidade, precisão e exatidão tanto em estudos clínicos para quantificação fluoxetina e trimetoprima, quanto em estudos forenses para quantificação de fluoxetina e haloperidol.

Palavras-chave: nanoLC-MS. HF-LPME. Fármacos.

ABSTRACT

Pharmaceutical drugs determination in biological samples, such as human plasma, is conducted with different purposes, among which can be pointed out therapeutic drug monitoring and forensic toxicology. However, due to high matrix complexity and protein-drug binding, the sample preparation step can become challenging. Hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) is a sample preparation technique of low cost, which uses low amounts of organic solvents and displays excellent clean-up efficiency and pre-concentration factors. Put together with nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nanoLC-MS), which provides highly efficient analysis and high detectability, along with reliable analyte identification, these techniques become ideal for biological matrices. In this study an analytical method was developed for determination of five pharmaceutical drugs in human plasma using HF-LPME and nanoLC-MS. Chromatographic separation of the five pharmaceutical drugs was achieved by gradient elution step during 15 min, in which the acetonitrile:water proportion varied from 30:70 to 100:0 (v/v), using formic acid 0.10% (v/v) as an additive in the mobile phase. The pharmaceutical drugs were monitored by fullscan acquisition, both for precursor and product ion scans. Extraction took place using 250 μL of human plasma, which was later avolumated to 10,0 mL with sodium chloride 10% (w/v), methanol 5% (v/v) and ammonium hydroxide (pH 10) as donor phase. The remaining optimal conditions for HF-LPME are 20 μL of 1-octanol as acceptor phase, stirring rate of 750 rpm and extraction duration of 30 min. Due to the use of different identification tools, such as exact mass, isotopic profile and fragmentation profile, the developed method can be used with selectivity and specificity in screening analysis for carbamazepine, diazepam, fluoxetine, haloperidol and trimethoprim in concentrations as low as 20 ng mL^{-1} . Aiming the application of the method for quantification of the selected pharmaceutical drugs in human plasma samples, satisfactory linearity was observed for carbamazepine, fluoxetine, haloperidol and trimethoprim in concentration ranges of 0.06-2.5, 0.02-1.5, 0.25-2.5 e 0.02-2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Additionally, adequate precision and accuracy was observed for the method, reaching up to 15%, just as lower limits of quantification ranging from 0.02 to 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and recovery rates from 3.00 to 95.4%. Thus it can be affirmed that the analytical method developed in this study can be used with selectivity, specificity, precision and accuracy in both clinical studies for fluoxetine and trimethoprim determination and forensic studies for fluoxetine and haloperidol determination.

Key-words: nanoLC-MS. HF-LPME. Pharmaceutical drugs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS SELECIONADOS.....	4
FIGURA 2 – MODOS DE AQUISIÇÃO BASEADOS EM VARREDURA DOS ÍONS EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS HÍBRIDO ARMADILHA DE ÍONS LINEAR-ORBITRAP.....	15
FIGURA 3 – MODOS DE AQUISIÇÃO BASEADOS EM SELEÇÃO DE ÍONS EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS HÍBRIDO ARMADILHA DE ÍONS LINEAR-ORBITRAP.....	16
FIGURA 4 – ELETROSPRAY NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	17
FIGURA 5 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SEGMENTO DE FIBRA OCA DE POLIPROPILENO.....	20
FIGURA 6 – ESQUEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA COM FIBRA OCA EM CONFIGURAÇÃO DE U.....	21
FIGURA 7 – PONTA DA COLUNA ANALÍTICA (A) ANTES DO PREENCHIMENTO E SEM RASPAGEM E (B) PREENCHIDA COM C18 DE 2,4 μM E APÓS RASPAGEM.....	29
FIGURA 8 – PREENCHIMENTO DA COLUNA COM AS PARTÍCULAS DE C18 EM SISTEMA PRESSURIZADO.....	30
FIGURA 9 – nanoLC-MS, ONDE (a) VÁLVULA DE INJEÇÃO E (b) COLUNA ANALÍTICA NA ENTRADA DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	32
FIGURA 10 – COLUNA ANALÍTICA EM FRENTE À ENTRADA DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS LTQ Orbitrap XL [®]	35
FIGURA 11 – ESPECTRO DA TRIMETOPRIMA - MODO ToF-MS.....	41
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO DEMONSTRANDO SATURAÇÃO DA COLUNA ANALÍTICA, ONDE (A) ENCAUDAMENTO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DA SOLUÇÃO PADRÃO (100 ng mL^{-1}) A PARTIR DA INJEÇÃO DE 5 μL E (B) EFEITO DE MEMÓRIA OBSERVADO NA CORRIDA DA PROVA EM BRANCO SUBSEQUENTE – MODO ToF-MS.....	43
FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDOS A PARTIR DOS MÉTODOS (A) GRADIENTE GRADIENTE 30:70 (v/v) – 80:20 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA E (B) ISOCRÁTICO 80:20 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA.....	45

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA (A) <i>FULLSCAN</i> E (B) DE ÍON EXTRAÍDO PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO – MODO ToF-MS	45
FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA HF-LPME DE 2 FASES COM 1-OCTANOL EM nanoLC-MS, ONDE (A) <i>FULLSCAN</i> E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO.....	48
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA HF-LPME DE 3 FASES COM 1-OCTANOL EM nanoLC-MS, ONDE (A) <i>FULLSCAN</i> E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO.....	49
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA HF-LPME EMPREGANDO AS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO, ONDE (A) <i>FULLSCAN</i> E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO	61
FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO DESENVOLVIDO NO nanoACQUITY	64
FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO CROMATOGRÁFICO BASEADO EM GRADIENTE 30:70 (v/v) – 0:100 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA COM DURAÇÃO DE 15 MINUTOS E AQUISIÇÃO MS1 NO ORBITRAP E MS2 NO ORBITRAP	65
FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO CROMATOGRÁFICO BASEADO EM GRADIENTE 30:70 (v/v) – 0:100 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA COM DURAÇÃO DE 15 MINUTOS E AQUISIÇÃO MS1 NO ORBITRAP E MS2 NA ARMADILHA DE ÍONS LINEAR	67
FIGURA 21 – FERRAMENTAS EMPREGADAS NA IDENTIFICAÇÃO DA CARBAMAZEPINA.....	72
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA O TESTE DE ESPECIFICIDADE	73
FIGURA 23 – PERFIL ISOTÓPICO PARA A FLUOXETINA, ONDE (A) ESPECTRO DA AMOSTRA DO VOLUNTÁRIO E (B) ESPECTRO DO BANCO DE DADOS DO TRACEFINDER v4.1	78
FIGURA 24 – ESPECTRO MS2 PARA FLUOXETINA, ONDE (A) AMOSTRA DO PACIENTE E (B) BANCO DE DADOS DO M/ZCLOUD.....	78
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO PARCIAL DA AMOSTRA PROVENIENTE DO VOLUNTÁRIO EM TERAPIA COM FLUOXETINA (20 mg/DIÁRIOS).....	79

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO	46
GRÁFICO 2 – EFEITO DO pH DA FASE DOADORA (n = 3) EM pH 7, 8, 9 10 E 11 PARA OS ANALITOS, ONDE AS DEMAIS CONDIÇÕES FORAM FIXADAS EM AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 8 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL	50
GRÁFICO 3 – EFEITO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (n = 3) EM 0, 750, 1000 E 1250 rpm PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 8 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL	52
GRÁFICO 4 – EFEITO DO TAMANHO DA FIBRA (n = 3) NOS COMPRIMENTOS DE 5, 6, 7 E 8 cm PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL.....	53
GRÁFICO 5 – EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO (n = 3) EM 10, 20, 30 E 45 min PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 6 cm, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL	55
GRÁFICO 6 – EFEITO DE ADIÇÃO DE SAL (n=3) À FASE DOADORA NAS CONCENTRAÇÕES DE 0, 5, 10, 20 E 30% (m/v) PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 6 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE METANOL.....	56
GRÁFICO 7 – EFEITO DE ADIÇÃO DE METANOL (n=3) À FASE DOADORA NAS CONCENTRAÇÕES DE 0, 5, 10 E 25% PARA OS ANALITOS.....	59
GRÁFICO 8 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO EASY-nLC	68
GRÁFICO 9 – CURVA ANALÍTICA PARA A CARBAMAZEPINA (n=3).....	69
GRÁFICO 10 – CURVA ANALÍTICA PARA O DIAZEPAM (n=3).....	69
GRÁFICO 11 – CURVA ANALÍTICA PARA A FLUOXETINA (n=3)	69
GRÁFICO 12 – CURVA ANALÍTICA PARA O HALOPERIDOL (n=3).....	70
GRÁFICO 13 – CURVA ANALÍTICA PARA A TRIMETOPRIMA (n=3).....	70

GRÁFICO 14 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS MÉDIAS DE FLUOXETINA (◆), NORFLUOXETINA (■) E A SOMA DE FLUOXETINA+NORFLUOXETINA (▲) OBSERVADAS DURANTE 10 SEMANAS PARA PACIENTES EM TERAPIA COM 20 mg DIÁRIAS DE FLUOXETINA.....80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS.....	9
TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS HPLC, UHPLC E nanoLC	13
TABELA 3 – MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO.....	24
TABELA 4 – PROGRAMAÇÃO PARA CONFECÇÃO DA PONTA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	29
TABELA 5 – PROGRAMA DE EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS ANALÍTICAS	30
TABELA 6 – PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ANALITOS.....	31
TABELA 7 – GRADIENTE UTILIZADO NOS TESTES PRELIMINARES NO nanoLC-MS.....	32
TABELA 8 – PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ANALITOS.....	34
TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES TERAPÊUTICAS E AVALIADAS POR HF-LPME PARA OS ANALITOS.....	34
TABELA 10 – PARÂMETROS INICIAIS DE AQUISIÇÃO MS1 (<i>FULLSCAN</i>) NO ORBITRAP.....	36
TABELA 11 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO MS1 (<i>FULLSCAN</i>) NO ORBITRAP	37
TABELA 12 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO MS2 (<i>FULLSCAN</i>) NA ARMADILHA DE ÍONS LINEAR.....	37
TABELA 13 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS UNIVARIADAMENTE.....	42
TABELA 14 – FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS DOS ANALITOS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	42
TABELA 15 – PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO nanoACQUITY.....	45
TABELA 16 – FORMA MAJORITÁRIA DOS ANALITOS ENCONTRADA EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	50
TABELA 17 – PARÂMETROS DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE HF-LPME...	60
TABELA 18 – ENERGIAS DE COLISÃO NORMALIZADAS OTIMIZADAS E ÍONS OBSERVADOS APÓS A FRAGMENTAÇÃO.....	63

TABELA 19 – PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO EASY-nLC.....	67
TABELA 20 – PARÂMETROS DE DESEMPENHO PRELIMINARES.....	71
TABELA 21 – PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO (n=3)	71
TABELA 22 – TESTE DE ESPECIFICIDADE	74
TABELA 23 – RECUPERAÇÃO E FATOR DE ENRIQUECIMENTO PARA O MÉTODO DESENVOLVIDO	75
TABELA 24 – RESULTADOS OBTIDOS PARA DILUIÇÃO DO PLASMA FORTIFICADO COM 5,0 µg mL ⁻¹ NA PROPORÇÃO 1:4 (n=3).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- “ <i>Analysis of Variance</i> ” – Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	- “ <i>Chemical Abstracts Service</i> ”
CBZ	- Carbamazepina
CID	- “ <i>Collision Induced Dissociation</i> ” - Dissociação induzida por colisão
C_i	- concentração inicial do analito na fase doadora
C_{org}	- concentração final do analito na fase aceptora
DLLME	- “ <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> ” - Microextração líquido-líquido dispersiva
DPX	- “ <i>Disposable Pipette Extraction</i> ” - Extração sortiva com ponteira descartável
DZP	- Diazepam
E	- fator de enriquecimento
ECN	- Energia de colisão normalizada
EIC	- “ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> ” - Cromatograma de íon extraído
EME	- “ <i>Electromembrane Extraction</i> ” - Extração em eletromembrana
ESI	- “ <i>Electrospray Ionization</i> ” - Ionização por eletrospray
FDA	- “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
FXT	- Fluoxetina
GABA	- “ <i>γ-aminobutyric acid</i> ” - Ácido γ -aminobutírico
GC	- “ <i>Gas Chromatography</i> ” - Cromatografia gasosa
GC-MS	- “ <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> ” - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HCD	- “ <i>High-energy Collision Dissociation</i> ” - Dissociação induzida por colisão de alta energia
HF-LPME	- “ <i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i> ” - Microextração líquida com fibra oca
HIV	- “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ” - Vírus da Imunodeficiência Humana
HLP	- Haloperidol
HPLC	- “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ” - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD - "*High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*" - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

HPLC-FLU - "*High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence detection*" - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

HPLC-UV - "*High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*" - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

ISRS - Inibidores seletivos da recaptção da serotonina

$K_{org/d}$ - Coeficiente de partição do analito entre fases aceptoras e doadoras

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol água

LC - "*Liquid Chromatography*" - Cromatografia líquida

LC-MS - "*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*" - Cromatografia líquida-espectrometria de massas

LC-MS/MS - "*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*" - Cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial

LLE - "*Liquid-Liquid Extraction*" - Extração líquido-líquido

LLOQ - "*Lower Limit of Quantification*" - Limite inferior de quantificação

LOD - "*Limit of Detection*" - Limite de detecção

LOQ - "*Limit of Quantification*" - Limite de Quantificação

Log P - Logaritmo a base 10 do coeficiente de partição

LPME - "*Liquid-Phase Microextraction*" - Microextração em fase líquida

LTQ - "*Linear Trap Quadrupole*[®]" - armadilha de íons linear registrada pela Thermo

MEPS - "*Microextraction by a Packed Sorbent*" - Microextração por sorvente empacotado

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MLS - Membrana líquida suportada

MRM - "*Multiple Reaction Monitoring*" - Monitoramento de reações múltiplas

MS1 - Aquisição dos íons precursores

MS2 - Aquisição dos íons produto

m/z - Razão massa/carga

nanoLC - "*Nano-liquid Chromatography*" - Nanocromatografia líquida

nanoLC-MS - "*Nano-liquid Chromatography-Mass Spectrometry*" - Nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

nanoLC-MS/MS - *"Nano-liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry"* -
Nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

$n_{eq,org}$ - quantidade do analito extraída pela fase aceptora na condição de
equilíbrio da HF-LPME

PTFE - Politetrafluoretileno

r - Coeficiente de correlação de Pearson

R - taxa de recuperação

RSD - *"Relative Standard Deviation"* - Desvio padrão relativo

SDME - *"Single Drop Microextraction"* - Microextração de gota única

SIM - *"Selective Ion Monitoring"* - Monitoramento seletivo de íons

SPE - *"Solid Phase Extraction"* - Extração em fase sólida

TMP - Trimetoprima

ToF - *"Time of Flight"* – Tempo de voo

ToF-MS - *"Time of Flight-Mass Spectrometry"* – *Espectrometria de massas por
tempo de voo*

UHPLC - *"Ultra-high performance liquid chromatography"* - Cromatografia
líquida de ultra performance

USP - *"United States Pharmacopeia"*

V_d - volume da fase doadora;

V_{org} - volume da fase aceptora;

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	FÁRMACOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	1
1.1.1	Bioanálise	1
1.1.2	Fármacos psicotrópicos e antibiótico	3
1.2	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	10
1.2.1	Técnicas cromatográficas miniaturizadas	10
1.2.2	Espectrometria de massas	14
1.3	PREPARO DE AMOSTRA	18
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	27
3.2	AMOSTRAS DE PLASMA	27
3.3	CONFECÇÃO DAS NANOCOLUNAS ANALÍTICAS	28
3.4	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO.....	31
3.4.1	Estudos de Ionização dos Analitos	31
3.4.2	Método Cromatográfico	31
3.4.3	Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca	33
3.5	TRANSPOSIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA SISTEMA ANALÍTICO DISTINTO.....	34
3.5.1	Estudos de Ionização e Fragmentação dos Analitos	35
3.5.2	Ajuste do Método Cromatográfico	36
3.5.3	Parâmetros de Aquisição do Espectrômetro de Massas	36
3.6	AVALIAÇÃO INICIAL DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO	37
3.6.1	Curva analítica.....	37
3.6.2	Precisão e exatidão	38
3.6.3	Seletividade e especificidade	38
3.6.4	Recuperação e fator de enriquecimento.....	38
3.6.5	Diluição da amostra	39

3.6.6	Aplicação do método a amostra de paciente em terapia com fluoxetina	39
4	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	41
4.1	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO.....	41
4.1.1	Estudos de Ionização dos Analitos	41
4.1.2	Otimização do Método Cromatográfico	42
4.1.3	Otimização da Técnica HF-LPME.....	47
4.2	TRANSPOSIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA SISTEMA ANALÍTICO DISTINTO.....	61
4.2.1	Estudos de Ionização e Fragmentação dos Analitos	62
4.2.2	Ajuste do Método Cromatográfico	63
4.3	AVALIAÇÃO INICIAL DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO	68
4.3.1	Curva analítica.....	68
4.3.2	Precisão e exatidão	71
4.3.3	Seletividade e especificidade	72
4.3.4	Recuperação e fator de enriquecimento.....	74
4.3.5	Diluição da amostra	76
4.3.6	Aplicação do método a amostra de paciente em terapia com fluoxetina	77
5	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	94
	APÊNDICE B – FERRAMENTAS EMPREGADAS NA IDENTIFICAÇÃO DO DIAZEPAM, FLUOXETINA, HALOPERIDOL E TRIMETOPRIMA.....	96
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DA SAÚDE DA UFPR.....	98
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 FÁRMACOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1.1.1 Bioanálise

A bioanálise compreende a determinação de fármacos e/ou seus metabólitos em amostras biológicas, como sangue total, plasma, urina, saliva e tecidos. O tipo de matriz selecionada para um estudo será determinado pelo objetivo do mesmo. Amostras de sangue total plasma são frequentemente utilizadas por refletirem um quadro geral das substâncias presentes no organismo de um indivíduo. Amostras de urina, por sua vez, são excelentes por serem o principal meio de excreção de diversas substâncias pelo organismo humano, fornecendo informações complementares às obtidas para sangue, além da disponibilidade de grandes volumes de amostra. A saliva também é uma matriz interessante para diversos tipos de estudo, principalmente devido à coleta da amostra ser realizada de forma não-invasiva e a correlação existente entre a concentração de fármacos em saliva e a concentração dos mesmos na sua forma livre, ou seja, não ligada a proteínas, no plasma humano. Já as amostras de tecido são analisadas com o propósito mais específico de se avaliar a distribuição de um fármaco no organismo de paciente, sendo a matriz menos estudada dentre as citadas (CASTILLO-PEINADO; LUQUE DE CASTRO, 2016; LORD; PAWLISZYN, 2000).

Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos voltados para a bioanálise é de grande importância para a obtenção de informações críticas sobre a biodisponibilidade, metabolismo, toxicologia, farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos. Tais informações são essenciais à descoberta e desenvolvimento de novas drogas e estudos clínicos (KAUFMANN, 2014; MULLETT, 2007).

Dentre estas aplicações, destaca-se o monitoramento de drogas terapêuticas, que se baseia na determinação da concentração dos fármacos alvo em amostras de plasma, por exemplo. Inicialmente, este era empregado principalmente para fármacos antiepilépticos e aminoglicosídeos que atuam como antibióticos, no entanto, sua aplicação tem se tornado mais ampla, abrangendo fármacos imunossupressores, antifúngicos, antivirais, quimioterápicos, psiquiátricos e outros

que atuam no sistema cardiovascular (ADAWAY; KEEVIL, 2012; HERON; AFIF, 2017; OELLERICH; KANSOW, WALSON, 2017; VERINGA et al., 2016).

Este monitoramento é empregado para melhorar o tratamento de diversas doenças, pois a concentração do fármaco na corrente sanguínea do paciente apresenta uma maior representatividade do que a dose administrada, devido à diferenças genéticas, ambientais e clínicas do indivíduo. Dessa forma, a resposta desejada do fármaco pode ser modulada para o paciente de acordo com as informações farmacocinéticas e farmacodinâmicas coletadas, resultando um tratamento com maior eficiência e menores efeitos adversos e toxicidade potencial (DECOSTERD et al., 2016; VERINGA et al., 2016).

Para fármacos psicotrópicos, o monitoramento de drogas terapêuticas permite uma diminuição do risco de intoxicação do paciente, principalmente nos casos em que o fármaco apresenta uma faixa de concentração terapêutica estreita e relativamente próxima da concentração considerada tóxica ao paciente, como o caso do haloperidol, um antipsicótico cuja faixa terapêutica é de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, porém passa a ser considerado tóxico em concentrações a partir de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DECOSTERD et al., 2016; SCHULZ et al., 2012). O monitoramento também permite uma menor incidência de efeitos adversos do tratamento e permite uma avaliação detalhada quando o paciente não está respondendo de maneira satisfatória à terapia. Tal abordagem tem fornecido uma alternativa mais segura para o tratamento psicofarmacológico para crianças, adolescentes, mulheres grávidas, lactantes e idosos (SCHÜTZE; SCHWARZ, 2016).

Nos casos em que o paciente está sob politerapia, como frequentemente é observado em quadros de epilepsia, o monitoramento de drogas terapêuticas é uma importante ferramenta devido à interações medicamentosas e a variação das concentrações plasmáticas dos medicamentos administrados, que, conseqüentemente, afetarão a resposta do paciente ao tratamento (ADAWAY; KEEVIL, 2012).

Em relação aos antibióticos, o monitoramento terapêutico de drogas aumenta a eficiência de tratamento, principalmente para pacientes em Unidades de Tratamento Intensivo, pois indivíduos criticamente doentes apresentam variações farmacodinâmicas que geralmente resultam em diferenças metabólicas quando comparados a pacientes mais saudáveis que servem como objeto de estudo para

determinação de doses recomendadas para estes fármacos (ROBERTS et al., 2014).

Outra importante aplicação da bioanálise é a toxicologia forense, onde análises de fluídos biológicos e tecidos são realizadas com o intuito auxiliar uma investigação de cunho legal, frequentemente caracterizando uma análise *post mortem*. Neste caso, o estudo pode ser conduzido para se averiguar a causa da morte, determinando as substâncias presentes e a concentração das mesmas no organismo de um indivíduo no momento de sua morte (SMITH; BLUTH, 2016).

Usualmente este tipo de estudo é conduzido pela análise de amostras de plasma, devido à sua disponibilidade. Dentre as classes de medicamentos frequentemente avaliadas, podem ser citados antidepressivos, antipsicóticos, neurolépticos, antiepilépticos, benzodiazepínicos, anti-hipertensivos, sedativos, anestésicos, antibióticos, analgésicos opióides e não-opióides, assim como drogas de abuso (GRAPP et al., 2018).

Grande parte destas substâncias pode ser definida como psicotrópicos, sendo que estas são investigadas devido à sua ocorrência frequente em intoxicações intencionais e acidentais, com destaque para sedativos, hipnóticos e benzodiazepínicos (BÉVALOT et al., 2016; HARRIS; BARRACLOUGH, 1997; LU et al., 2014; SHARMA et al., 2018).

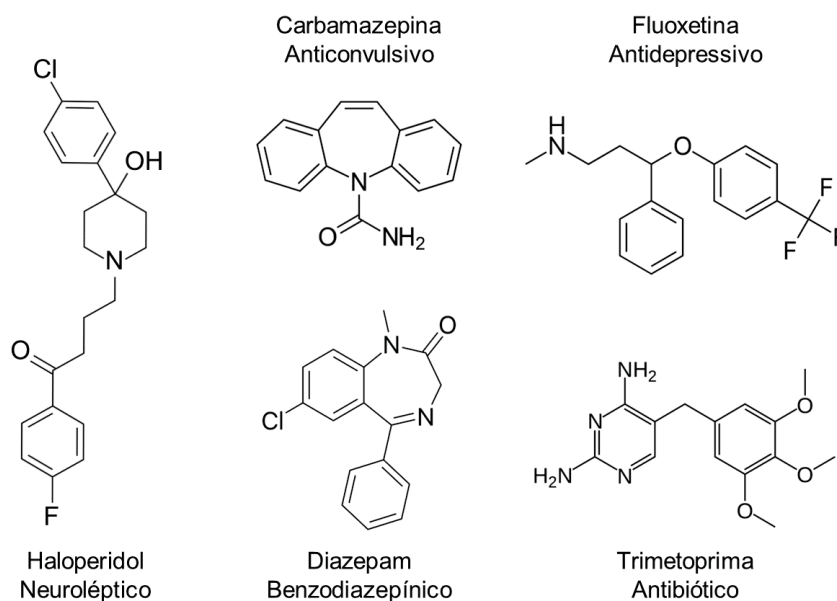
Psicotrópicos também estão associados a acidentes veiculares devido à hipersonolência, sendo que, dentre os fármacos psiquiátricos, os benzodiazepínicos apresentam a correlação mais conhecida e estudada (ENGELAND et al., 2007; PAGEL, 2017). Em um levantamento envolvendo quatro capitais brasileiras, dentre elas Curitiba, realizado pela Associação Brasileira dos Departamentos Trânsito em 1997, os benzodiazepínicos foram reportados em cerca de 3,4% dos casos de acidentes de trânsito, ficando atrás apenas das substâncias psicoativas álcool, com 27,2%, e maconha, com 7,7% (ABDETRAN, 1997).

1.1.2 Fármacos psicotrópicos e antibiótico

Os fármacos avaliados neste estudo pertencem às classes supracitadas: quatro psicotrópicos (carbamazepina, diazepam, fluoxetina e haloperidol) e um antibiótico (trimetoprima). Suas estruturas estão representadas na FIGURA 1. Estes analitos foram selecionados devido a sua ampla utilização no Brasil, como é o caso

dos psicotrópicos, e importância no tratamento e prevenção de infecções de pacientes imunocomprometidos, no caso da trimetoprima. Adicionalmente, as propriedades físico-químicas destes fármacos permitem sua coextração durante o preparo de amostras, tornando possível o desenvolvimento de um método analítico para determinação simultânea dos mesmos.

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS SELECIONADOS



FONTE: A autora (2018).

A carbamazepina é um medicamento antiepiléptico e analgésico específico para nevralgia trigeminal, também utilizado no tratamento de transtorno bipolar, sendo particularmente eficaz nos episódios de mania. O fármaco apresenta uma estrutura semelhante a dos antidepressivos tricíclicos, e seu mecanismo de ação se baseia no bloqueio uso-dependente de canais de sódio, de forma que este bloqueio é observado com maior intensidade em células hiperexcitadas e que, por sua vez, são as responsáveis pelos episódios epilépticos e origem das dores neuropáticas (RANG et al., 2016).

A carbamazepina (Tegretol[®]) é um dos fármacos antiepilépticos mais utilizados no Brasil, sendo considerado um fármaco de primeira linha para todos os tipos de crise de epilepsia focal sintomática, mesmo para mulheres grávidas, lactantes, idosos, pacientes com depressão e com rebaixamento mental (BETTING et al., 2003). No entanto, estudos indicam que o fármaco tem potencial teratogênico, estando relacionado com má formações neurológicas e craniofaciais, retardos no

desenvolvimento neurológico e no crescimento (AHMED; EL-GAREIB, 2017; BATH; SCHARFMAN, 2013).

Após a administração da carbamazepina via oral, a concentração plasmática máxima média de $7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ é atingida em 2 a 3,5 horas (MORENO et al., 2004). O fármaco passa a ser considerado tóxico a partir de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ seria suficiente para induzir o paciente a um estado de coma (SCHULZ et al., 2012). A literatura relata diferentes casos de intoxicação por carbamazepina, porém a grande maioria apresenta natureza intencional (GOKTAS et al., 2010; KURTZ et al., 2017; TAKAMIYA et al., 2006).

O diazepam (Valium[®]) é um medicamento benzodiazepínico com propriedades ansiolíticas, sedativas, relaxantes musculares e anticonvulsivantes, entre outras. Dentre os medicamentos estudados neste trabalho, o diazepam é o único considerado de tarja preta, e seu uso pode causar dependência (AZEVEDO et al., 2016). Atua ao se ligar a sítios reguladores de receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central, aumentando a afinidade entre o receptor e o neurotransmissor e levando a sedação do paciente (RANG et al., 2016).

Para este fármaco, a concentração plasmática máxima é atingida em cerca de 1 a 1,5 horas após sua administração. Após a administração de 10 mg de diazepam a concentração plasmática máxima observada é próxima a $510,8 \text{ ng mL}^{-1}$ (ROUINI et al., 2008). Quando administrado via intranasal e retal numa dose de 20 mg, as concentrações máximas são 378 e 328 ng mL^{-1} , respectivamente (HENNEY et al., 2014). O diazepam exibe toxicidade em concentrações plasmáticas acima de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, apesar desta concentração não ser próxima da concentração encontrada no plasma de pacientes em terapia com este medicamento, o diazepam, como outros benzodiazepínicos, é frequentemente utilizado em intoxicações intencionais, e seu uso induz a hipersonolência, o que está ligado a acidentes de trânsito (ABDETRAN, 1997; BÉVALOT et al., 2016; ENGELAND et al., 2007; PAGEL, 2017; SHARMA et al., 2018).

O haloperidol (Haldol[®]) é um antipsicótico pertencente ao grupo das butirofenonas, que é frequentemente prescrito para esquizofrenia, síndrome de Tourette e episódios de mania em pacientes com transtorno bipolar, porém, o uso prolongado do medicamento apresenta uma incidência significativa de efeitos

adversos, como depressão e ansiedade (KATAGIRI et al., 2012; SCAHILL et al., 2000).

Uma das possíveis causas da esquizofrenia é um desregulamento de dopamina presente no cérebro, assim, os antipsicóticos de primeira geração, como é o caso do haloperidol, são antagonistas dos receptores D_2 de dopamina. Dessa forma, ao se ligar a tais receptores, o antipsicótico bloqueia o sítio da dopamina e diminui sua hiperatividade (RANG et al., 2016). Após uma injeção intramuscular de decanoato de haloperidol, a concentração plasmática de haloperidol aumenta gradativamente, atingindo a concentração máxima de $12,2 \text{ ng mL}^{-1}$ em 6 dias. Com a administração via oral de haloperidol, a concentração plasmática máxima de $18,2 \text{ ng mL}^{-1}$ é atingida em aproximadamente 4,9 horas após a ingestão do medicamento (NAYAK et al., 1987).

Dentre os fármacos selecionados, o haloperidol é o que apresenta a faixa de concentração terapêutica mais estreita, de 1 a 20 ng mL^{-1} , e próxima da concentração considerada tóxica, de 50 ng mL^{-1} , como citado anteriormente (SCHULZ et al., 2012). Por este motivo, a literatura apresenta uma série de casos de overdose acidental e intencional (HANSEN ET AL., 1997; KHEL ET AL., 2018; MEYER-MASSETTI et al., 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos para quantificação deste fármaco em plasma humano é interessante tanto para monitoramento terapêutico quanto para a toxicologia forense.

A fluoxetina (Prozac[®]) é um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), comumente prescrita para distúrbios depressivos e de ansiedade, devido à baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais. Devido à essas características, é um medicamento frequentemente prescrito para gestantes e lactantes (ALVIM-JR et al., 2016; PHAM et al., 2018). Ao inibir a recaptação de serotonina pelos terminais nervosos, o medicamento aumenta os níveis e efeitos da serotonina no organismo do paciente (RANG et al., 2016). A molécula exibe atividade quiral, sendo que ambos enantiômeros apresentam atividades farmacológicas semelhantes, porém, a S-fluoxetina é eliminada mais lentamente, sendo o enantiômero predominante no plasma (MAGYAR et al., 2003).

Após 2,5 a 7 horas da administração de uma dose diária de 40 mg de fluoxetina, a concentração plasmática atinge um pico de aproximadamente $194,82 \text{ ng mL}^{-1}$ (PAN et al., 2002). O fármaco passa a exibir toxicidade significativa a partir da concentração plasmática de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e, apesar de a fluoxetina ser considerada

um antidepressivo seguro, uma parcela da população apresenta um metabolismo lento para o fármaco, o que eleva sua toxicidade potencial uma vez que sua meia-vida no organismo do paciente aumenta em até duas vezes (KANDASAMY et al., 2010; SCHULZ et al., 2012). Adicionalmente, o fármaco é prescrito com cautela para menores de 18 anos devido à incidência de idealização suicida nesta faixa etária quando a concentração plasmática do princípio ativo ultrapassa a faixa terapêutica (ALTAMURA et al., 1994; RANG et al., 2016).

Os fármacos psicotrópicos selecionados estão entre os mais prescritos no Brasil dentro de sua classe. No estudo de Böger et al. (2017) foi relatado que na cidade de Curitiba o haloperidol e o diazepam correspondem a 26,98 e 18,73%, respectivamente, das prescrições realizadas em Centros de Atenção Psicossocial do município.

Similarmente, o estudo de Alves e Oliveira (2014) realizado no município de Tijucas do Sul, Paraná, localizado a 55 km da capital, a fluoxetina foi o segundo antidepressivo com maior saída em farmácias públicas em 2014, compreendendo 46% das prescrições. De forma semelhante, o estudo de Cruz et al. (2015) indicou que, no período de 2008 a 2012, a fluoxetina foi o psicotrópico de maior dispensação da farmácia municipal de Terra Roxa D'Oeste, Paraná, seguido de amitriptilina, diazepam e carbamazepina. Também no estado do Paraná, em uma avaliação realizada por Machado et al. (2009), dos antipsicóticos mais utilizados na Emergência Psiquiátrica do Hospital Municipal de Maringá, o haloperidol aparece como o mais empregado, e, somando sua utilização via oral, intravenosa e como decanoato de haloperidol, essa abrange cerca de 61% dos pacientes.

Fora do estado do Paraná, um levantamento conduzido por Andrade et al. (2004) a partir de receitas coletadas em novembro de 2000 em farmácias de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, indica que os dois medicamentos mais receitados por psiquiatras são a fluoxetina e o diazepam, compondo 42,0% e 25,8% das prescrições, respectivamente. Em relação a antidepressivos, os autores afirmam que o mais prescrito foi a fluoxetina, totalizando 68,8% das receitas contendo medicamentos desta classe provenientes de todas as especialidades médicas. Também na cidade de Ribeirão Preto, o estudo de Freitas-Lima et al. (2013) avaliou as prescrições de antiepilépticos para pacientes adultos e idosos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, onde a carbamazepina foi a mais receitada,

totalizando 72,3% dos pacientes, sendo administrada como monoterapia ou em combinação com outros epiléticos.

No estudo de Gruber e Mazon (2014), a partir do levantamento dos medicamentos psicotrópicos receitados na cidade de Mafra, Santa Catarina, foi possível constatar que, no ano de 2011, 36,8% da população fez uso destes fármacos. Neste ano, o psicotrópico mais prescrito foi a fluoxetina, e os demais fármacos selecionados nesse estudo, carbamazepina, diazepam e haloperidol, ficaram na quarta, quinta e oitava posição, respectivamente.

Por fim, a trimetoprima é um antibiótico utilizado no tratamento de doenças infecciosas, principalmente infecções do trato urinário e pneumonia. Este medicamento é usualmente prescrito em associação ao sulfametoxazol devido à sua ação sinérgica. Tal combinação é denominada cotrimoxazol (Bactrim[®]) e é frequentemente indicada para o tratamento de infecções em indivíduos portadores de HIV (HO; JUURLINK, 2011). Sulfonamidas, como o sulfametoxazol, inibem a síntese de ácido fólico por micro-organismos, e a trimetoprima inibe a eficiência da enzima responsável pela sua redução à forma ativa, que seria empregada pelo agente patógeno na síntese de aminoácidos (RANG et al., 2016).

No Brasil, a trimetoprima é frequentemente utilizada no tratamento de infecções urinárias, e atualmente é o antibiótico indicado pelo Ministério da Saúde como quimioprevenção para filhos de mulheres portadoras de HIV durante seu primeiro ano de vida (Ministério da Saúde, 2009, 2010). Em relação a sua farmacocinética, após a administração como cotrimoxazol via oral, contendo 160 mg de trimetoprima, a concentração plasmática máxima de aproximadamente 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é atingida em cerca de 2 horas (MOORE et al., 1996). A trimetoprima assume uma concentração tóxica a partir de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SCHULZ et al., 2012).

As propriedades físico-químicas dos fármacos selecionados apresentam grandes variações, como é possível observar na TABELA 1, devido ao fato de serem pertencentes a diferentes classes e apresentarem diferenças estruturais e funcionais.

Dentre estas propriedades, visando a avaliação desses fármacos em estudos clínicos, é considerada mais crítica a ligação do fármaco a proteínas, uma vez que ao ultrapassar a porcentagem de 80% do fármaco ligado a proteínas esta propriedade influencia drasticamente tanto a capacidade do fármaco transferir-se da

corrente sanguínea para diferentes tecidos, quanto a recuperação do analito ao se realizar a extração do mesmo a partir de amostras de plasma (SCHEIFE, 1989).

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS

Fármaco	CAS	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	pKa ₁	pKa ₂	Ligação a proteínas (%)	Concentração plasmática máxima – via oral (ng mL ⁻¹)
Trimetoprima (TMP)	738-70-5	290,3177	1,26	7,16	17,33	42-46	1950 ^a
Carbamazepina (CBZ)	298-46-4	236,2686	2,1	-3,8	15,96	76	7300 ^b
Diazepam (DZP)	439-14-5	284,74	2,63	2,92	-	98,5	510,8 ^c
Haloperidol (HLP)	52-86-8	375,86	3,7	8,05	13,96	92	18,2 ^d
Fluoxetina (FXT)	54910-89-3	309,3261	4,09	9,8	-	94,5	194,82 ^e

CAS: número de registro no banco de dados de Chemical Abstracts Service. Log P: logaritmo da constante de partição; pKa₁: constante de dissociação ácida do sítio mais ácido; pKa₂: constante de dissociação ácida do sítio menos ácido.

FONTE: DrugBank, exceto: a - Moore et al. (1996), b - Moreno et al. (2004), c - Rouini et al. (2008), d - Nayak et al. (1987), e - Pan et al. (2002).

Uma característica crítica para a extração de um analito em matrizes aquosas, como fluídos biológicos, é a faixa de pH em que o composto se encontra neutro que, devido aos valores de constante de dissociação ácida para os fármacos selecionados neste estudo, é comum para todos os analitos, permitindo sua extração simultânea.

Como citado anteriormente, o plasma humano é uma das principais matrizes biológicas avaliada para a determinação de fármacos de uso humano, tanto para estudos de monitoramento terapêutico de fármacos quanto para estudos toxicológicos. Esta matriz é composta por água, proteínas, glicoproteínas, fosfoproteínas, peptídeos, como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, lipídeos, ácidos graxos, carboidratos e íons. Devido ao seu alto teor proteico, sendo a proteína mais abundante a albumina, presente numa concentração de aproximadamente 60 mg mL⁻¹, a remoção destes interferentes previamente a análises se torna essencial. Geralmente é realizada uma etapa de precipitação de proteínas fazendo uso de solventes orgânicos, no entanto, isto pode resultar na co-precipitação dos fármacos ou sua oclusão nos pellets, que correspondem aos aglomerados de proteína formados, ocasionando a perda dos fármacos durante a

manipulação da amostra, principalmente daqueles com alta ligação a proteínas (MAHBOOB et al., 2015, MULLETT, 2007).

Dessa forma, devido às baixas concentrações destes fármacos nas faixas terapêuticas e a alta complexidade de amostra, principalmente a abundância de proteínas no plasma, há a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas unindo preparo de amostra eficiente e técnicas analíticas com alta detectabilidade e seletividade.

1.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

1.2.1 Técnicas cromatográficas miniaturizadas

Diversas matrizes biológicas, como plasma, urina, saliva, leite materno e cabelo, podem ser utilizadas na determinação de fármacos e seus metabólitos em estudos de farmacocinética, toxicocinética, bioequivalência e farmacodinâmica. Para realizar tais estudos são empregadas diversas técnicas analíticas, como titulometria, espectrofotometria, eletroforese capilar e técnicas cromatográficas, dentre elas a cromatografia líquida de alta eficiência (*“High Performance Liquid Chromatography”* – HPLC, ou simplesmente LC) e a cromatografia gasosa (*“Gas Chromatography”* – GC) (QUEIROZ, 2009; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017; ULRICH; MARTENS, 1997).

Para a análise de misturas complexas como as encontradas em sistemas biológicos, a técnica de LC, quando acoplada a determinados sistemas de detecção, é considerada uma técnica de separação que fornece seletividade, precisão e exatidão satisfatórias. Adicionalmente, grande parte dos fármacos administrados para seres humanos não apresenta a volatilidade e/ou estabilidade térmica para determinação por GC, impossibilitando a uso desta técnica sem uma etapa adicional de derivatização dos analitos. Dessa forma, a HPLC se torna a técnica mais aplicada para este tipo de análise (SIDDIQUI et al., 2017).

Apesar disto, análises por HPLC exibem uma menor eficiência e seu acoplamento com espectrometria de massas é complexo quando comparado a GC, devido, respectivamente, ao maior diâmetro da coluna analítica e ao grande volume

de fase móvel na interface entre os equipamentos. Assim, o interesse em miniaturizar a técnica existe há várias décadas.

Os primeiros avanços na miniaturização da cromatografia líquida ocorreram na década de 60, quando Horvath et al. (1967) utilizaram uma coluna de aço inox com diâmetro interno de 1 mm e comprimento de 2 m para realizar a separação de nucleotídeos, dando início a era das colunas microbore. Cerca de dez anos depois, foram desenvolvidas as primeiras microcolunas, constituídas por um tubo de politetrafluoretileno (PTFE) de 500 μm de diâmetro interno, e colunas capilares de vidro, com diâmetro interno de 50 a 200 μm (ISHII et al., 1977; NOVOTNY; TSUDA, 1978).

Anos mais tarde, Karlsson e Novotny (1988) realizaram a separação cromatográfica com colunas empacotadas empregando capilares de sílica, técnica que veio a ser denominada de nanoLC. Atualmente, as colunas capilares empregadas em nanoLC têm sido feitas de sílica fundida, frequentemente revestidas com um material que lhes garante resistência mecânica, como a poli-imida, semelhante às colunas capilares de GC. O diâmetro interno varia de 10 a 150 μm , e o preenchimento destas colunas pode ser feito com partículas de diâmetro igual ou inferior a 5,0 μm , resultando em separações cromatográficas mais eficientes de acordo a diminuição das partículas. (BLUE et al., 2017; GAMA; COLLINS; BOTTOLI, 2013; NOGA et al., 2007).

A miniaturização da cromatografia líquida foi acompanhada pelo desenvolvimento de equipamentos para cromatografia líquida de ultra performance (*“Ultra-high performance liquid chromatography”* – UHPLC), que foram disponibilizados comercialmente pela primeira vez em 2004. Este tipo de equipamento se tornou componente essencial dos sistemas de nanoLC devido à sua capacidade de suportar altas pressões, apesar de poder ser empregado em análises com colunas de dimensões maiores, com diâmetros internos de aproximadamente 2,1 mm (FEKETE et al., 2014; WALTER; ANDREWS, 2014).

Contudo, como a nanoLC aplica diversas modificações nas dimensões da coluna analítica, estas devem ser acompanhadas por uma série de adaptações no sistema cromatográfico, como alterações nas conexões, sistema de injeção e parâmetros instrumentais, que serão resumidamente abordados a seguir.

A redução das dimensões da coluna analítica de nanoLC resulta no uso de uma vazão inferior, na faixa de 100 a 300 nL min^{-1} , sendo que cromatógrafos a

líquido convencionais operam usualmente a vazões de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ a $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. O uso de vazões tão baixas resulta em um menor consumo de solvente, cerca de $15 \mu\text{L}$ de fase móvel para uma análise de 1 hora em uma coluna de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, comparado a cerca de 60 mL para uma análise de mesma duração em LC convencional. Contudo, vazões reduzidas apresentam a desvantagem de uma análise mais longa, sendo que o tempo total gasto para a análise de uma amostra, compreendendo injeção, carregamento da amostra, separação cromatográfica e reequilíbrio da coluna, varia de 40 a 90 minutos (NOGA et al., 2007).

Outra desvantagem decorrente da redução do diâmetro interno da coluna analítica é a consequente redução da quantidade de fase estacionária, que, por sua vez, resulta na facilidade da saturação da fase estacionária. Dessa forma, a nanoLC pode apresentar um efeito de memória significativo. Para minimizar tal efeito, após cada injeção deve ser realizada a limpeza da coluna e, em alguns casos, há necessidade da execução de corridas como prova em branco após a injeção de uma amostra (NOGA et al., 2007).

O diâmetro da coluna capilar também proporciona uma menor diluição da banda cromatográfica durante a eluição dos analitos, uma vez que tal diluição é proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna analítica. Assim, o uso da nanoLC resulta num aumento de concentração de até 200 vezes para a injeção de uma mesma amostra em relação a LC convencional e, conseqüentemente, permite o uso de menores volumes de injeção visando a obtenção de uma resposta similar a obtida por LC convencional (NAZARIO et al., 2015).

Para manter o perfil de separação, é necessário estabelecer as conexões do sistema cromatográfico de forma a minimizar o volume morto antes e após a coluna analítica, uma vez que este resultaria na dispersão dos analitos e conseqüentemente, a separação seria menos eficiente. Assim, a configuração ideal seria atingida utilizando capilares de sílica de diâmetro interno e comprimento pequenos, e a saída da coluna cromatográfica deve estar muito próxima ao sistema de detecção (NAZARIO et al., 2015; SESTÁK; MORAVCOVÁ; KAHLE, 2015).

O volume de amostra injetado depende das dimensões da coluna e do volume do *loop* de amostra. Por exemplo, para uma coluna com diâmetro interno de $75 \mu\text{m}$ e comprimento de 15 cm , o volume de injeção máximo varia de 3 a 140 nL , de acordo com o fator de retenção do analito. Para realizar a injeção de volumes tão pequenos, é necessário que o cromatógrafo faça uso de uma alça de amostragem

interna à válvula de injeção, onde o volume de amostras seria estabelecido pela própria válvula. Dessa forma, para trocar o volume de injeção seria necessário trocar esta válvula. Assim, os sistemas cromatográficos comerciais mais comuns são equipados com um *loop* de amostra externo com volumes de poucos microlitros que fornecem injeções com boa reprodutibilidade e exatidão (NAZARIO et al., 2015; SESTÁK; MORAVCOVÁ; KAHLE, 2015).

Para permitir a injeção de amostras com volumes acima do indicado para a coluna, realiza-se a injeção da amostra com um solvente de baixo poder de eluição, como a água no caso da cromatografia de fase reversa, de forma que os analitos chegarão até a coluna e se concentrarão no início da fase estacionária, realizando a pré-concentração do analito e formando uma banda cromatográfica estreita. Mesmo com a injeção deste volume superior, de no máximo 5 μL , a nanoLC apresenta um consumo de amostra muito baixo em comparação com outras técnicas analíticas (BLUE et al., 2017).

A TABELA 2 apresenta uma comparação entre as técnicas de HPLC, UHPLC e nanoLC quanto aos parâmetros experimentais empregados.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS HPLC, UHPLC E nanoLC

Parâmetros	HPLC convencional	UHPLC convencional ^a	nanoLC
Diâmetro interno médio de coluna	4,6 mm	2,1 mm	75 μm
Tamanho de partícula	5,0 – 10,0 μm	1,5 – 2,0 μm	1,3 – 5,0 μm
Vazão	0,5 – 2,5 mL min^{-1}	0,1 – 0,5 mL min^{-1}	100 – 300 nL min^{-1}
Tempo de análise	5 – 40 min	1,5 – 30 min ^b	40 – 90 min
Volume de injeção	20 – 200 μL ^c	0,1 – 20 μL ^{b,d}	4 nL – 10 μL
Concentração relativa observada ^e	1	5,3	8459

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, nanoLC – nanocromatografia líquida, UHPLC – cromatografia líquida de ultra performance.

FONTE: Noga et al. (2007), exceto: a - Walter; Andrews (2014), b - Dong; Zhang (2014), c - Fernández-Ramos et al. (2014), d - Fekete et al. (2014), e - Thermo Fisher Scientific Inc. (2010).

Unindo estas características, quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência, a nanoLC possibilita que, a partir de um pequeno volume de amostra, de poucos microlitros, obtenha-se uma melhor detectabilidade e maior eficiência, assim como um menor consumo de solventes e menor geração de resíduos.

1.2.2 Espectrometria de massas

Para que o uso de uma técnica cromatográfica seja bem-sucedido em análises de amostras complexas, a escolha do detector é uma etapa crítica, pois este deve ser capaz de monitorar todos os analitos simultaneamente, mesmo na presença de possíveis interferentes endógenos. Dentre os possíveis detectores empregados a determinação pela técnica de LC, os detectores eletroquímicos e de fluorescência são altamente seletivos, porém, permitem a determinação de apenas uma parcela de analitos (SWARTZ, 2010). Já os detectores espectrofotométricos, embora sejam frequente empregados em estudos visando a determinação de fármacos em diversas matrizes, pois os mesmos apresentam simplicidade e baixo custo operacional, seu uso não é ideal devido a uma maior susceptibilidade a interferentes capazes de coeluir com os analitos, além de uma baixa detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017; WU et al., 2008).

O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas, no modo simples ou sequencial, ("*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*" – LC-MS, "*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*" – LC-MS/MS) é uma ferramenta de grande utilidade para a determinação de fármacos em matrizes biológicas, pois trata-se de um detector universal com uma boa detectabilidade, com limites de detecção na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. (GAMA; COLLINS; BOTTOLI, 2013; NIESSEN, 1999; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017).

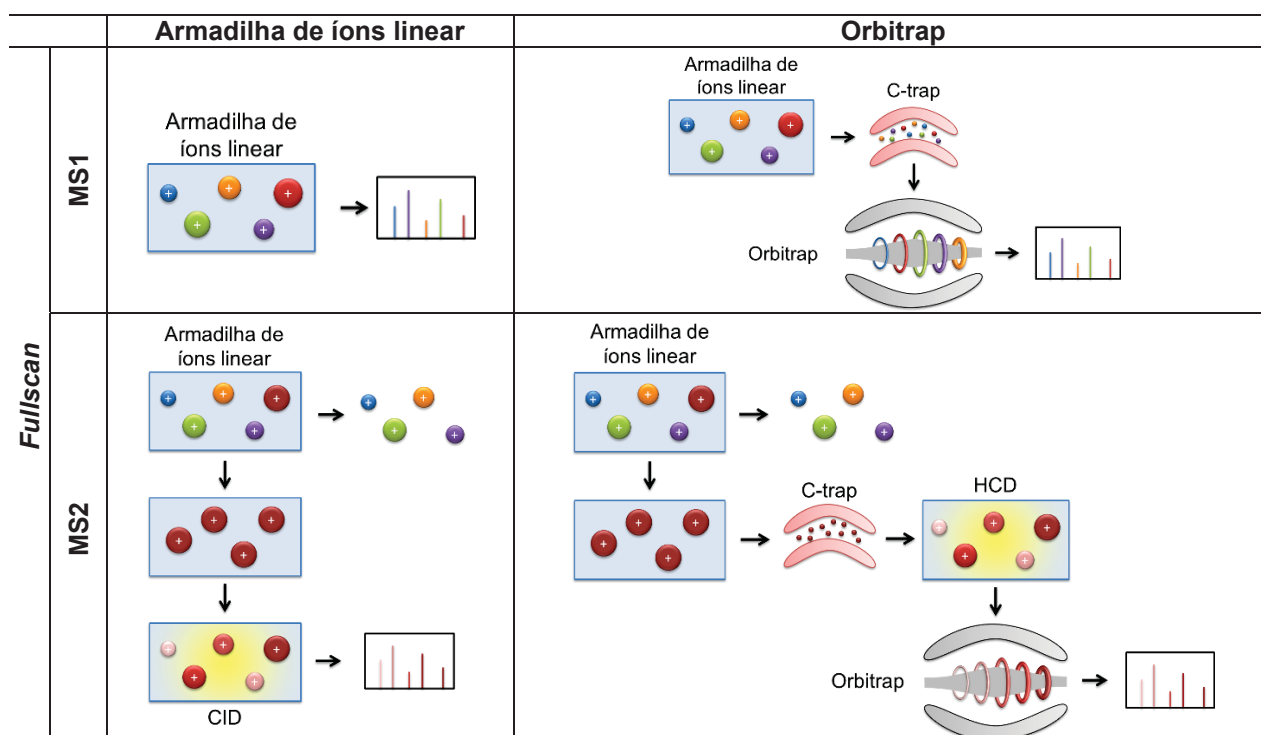
Comparadas à detecção espectrofotométrica, as técnicas LC-MS e LC-MS/MS fornecem uma maior confiabilidade de identificação dos analitos, principalmente quando são empregados analisadores de massa de alta resolução, como o tempo de voo ("*Time of Flight*" – ToF) e o Orbitrap.

O ToF é um analisador de massas capaz de diferenciar a razão massa/carga dos íons de acordo com o tempo necessário para que um íon percorra uma determinada distância após uma região de aceleração (GUILHAUS et al., 1997). Já o Orbitrap se baseia na acumulação de íons em um quadrupolo curvado, denominado C-trap, e posterior injeção dos íons no interior do Orbitrap, e a partir da frequência de rotação dos íons em torno do eixo do analisador de massas é possível distinguir os íons de acordo com a sua razão massa/carga (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).

Dentre outras aplicações, estes analisadores de massa são usualmente empregados na análises de *screening* feitas pelo modo de aquisição *fullscan*, onde, a partir de espectros gerados por varredura, moléculas desconhecidas podem ser identificadas com base na sua massa exata e perfil isotópico (GRAPP et al., 2018; XIAN et al., 2012; XIAO et al., 2012).

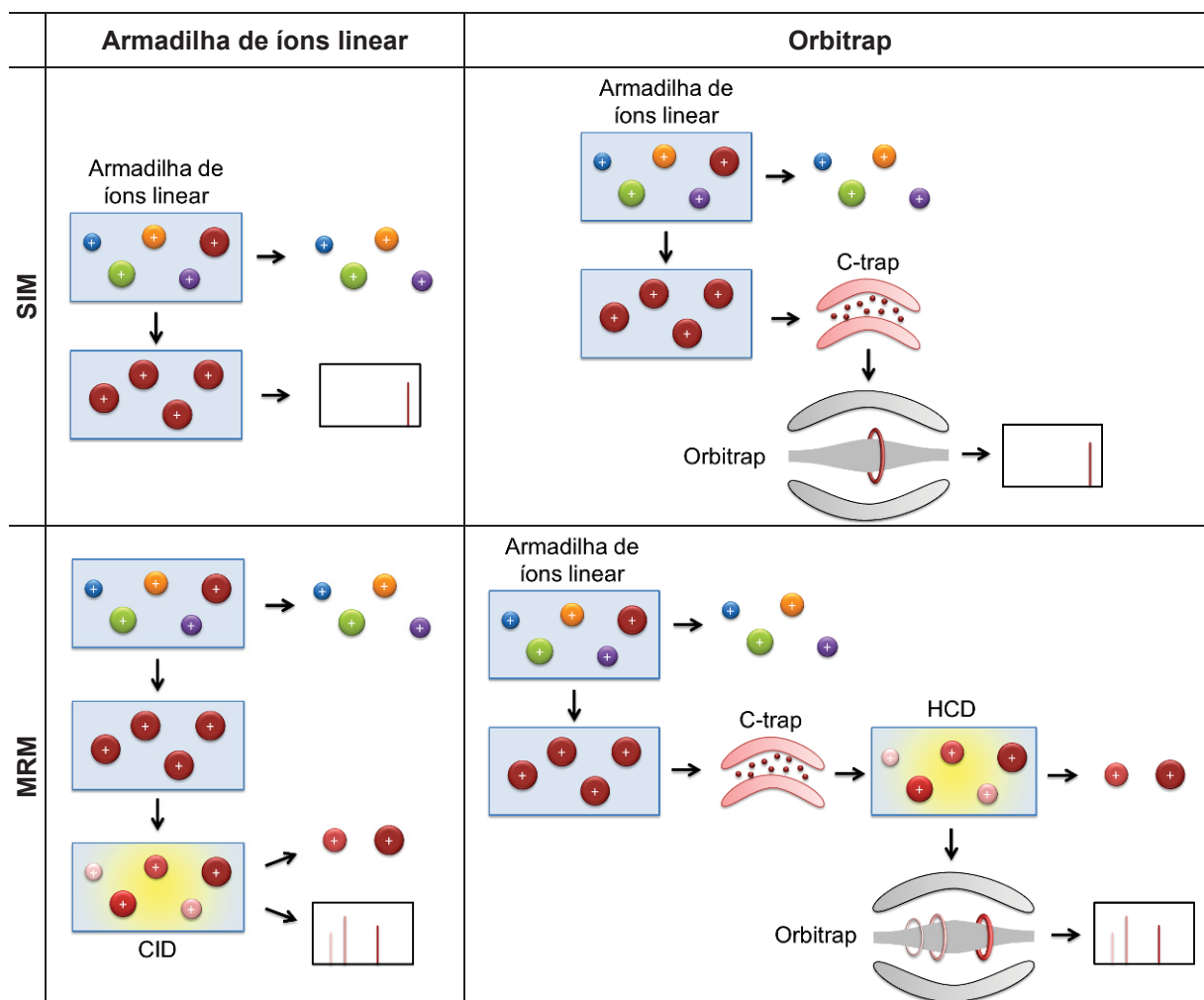
O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas também fornece uma maior seletividade devido a uma série de estratégias que podem ser adotadas visando o isolamento do analito dos demais componentes da matriz, seja por deconvolução espectral ou experimentos distintos capazes de isolar os íons de interesse com base na sua razão massa/carga (m/z) característica, como o monitoramento seletivo de íons (*“Selective Ion Monitoring”* – SIM), ou até mesmo isolarem um íon precursor para fragmentação e formação de íons produto, monitorando a transição entre estas duas espécies, como é o caso do monitoramento de reações múltiplas (*“Multiple Reaction Monitoring”* – MRM) (YUAN et al., 2015). As FIGURAS 2 e 3 apresentam os diferentes modos de aquisição possíveis em espectrômetros de massas híbridos armadilha de íons linear-Orbitrap.

FIGURA 2 – MODOS DE AQUISIÇÃO BASEADOS EM VARREDURA DOS ÍONS EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS HÍBRIDO ARMADILHA DE ÍONS LINEAR-ORBITRAP



MS1 – Aquisição dos íons precursores, MS2 – Aquisição dos íons produto, CID – Dissociação induzida por colisão, HCD – Dissociação induzida por colisão de alta energia

FIGURA 3 – MODOS DE AQUISIÇÃO BASEADOS EM SELEÇÃO DE ÍONS EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS HÍBRIDO ARMADILHA DE ÍONS LINEAR-ORBITRAP



SIM – Monitoramento de íon seletivo, MRM – Monitoramento de reações múltiplas, CID – Dissociação induzida por colisão, HCD – Dissociação induzida por colisão de alta energia

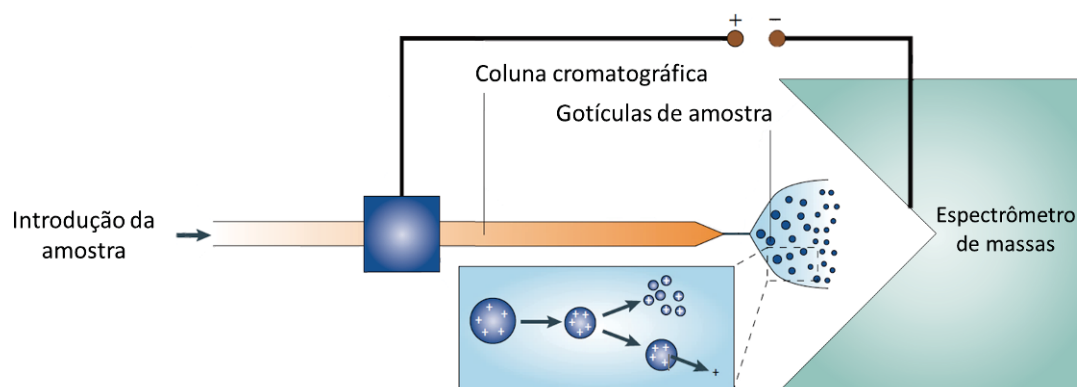
Fonte: A autora (2019)

Em relação à hifenação de técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas, a nanoLC apresenta características que permitem um acoplamento de maior facilidade, já que o volume eluído pela coluna é substancialmente reduzido quando comparado àquele proveniente das colunas clássicas de HPLC, dando origem aos equipamentos nanoLC-MS e nanoLC-MS/MS. Neste sentido, quando a ionização é feita por eletrospray (“*Electrospray Ionization*” – ESI), que corresponde ao modo mais empregado para a cromatografia líquida, a amostra é eluída da coluna até uma ponta cônica dando origem a um *spray* próximo a entrada do espectrômetro de massas. Esta ponta cônica pode ser um componente da própria coluna analítica, que eliminará eventuais problemas devido à presença de

volume morto após a coluna, ou pode ser conectada a coluna na forma de um capilar de sílica vazio (GAMA; COLLINS; BOTTOLI, 2013; SESTÁK; MORAVCOVÁ; KAHLE, 2015; STEEN; MANN, 2004).

Devido ao menor volume de fase móvel, as gotículas que compõe tal *spray* são menores e, conseqüentemente, a volatilização da fase móvel e a ionização das moléculas através da aplicação de um potencial é mais eficiente. A formação do *spray* é representada na FIGURA 4, na qual o fim da coluna analítica apresenta a ponta em forma de cone (SESTÁK; MORAVCOVÁ; KAHLE, 2015; STEEN; MANN, 2004).

FIGURA 4 – ELETROSPRAY NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS



FONTE: Adaptado de STEEN; MANN (2004).

No trabalho de Berlioz-Barbier et al. (2015) a nanoLC-MS/MS foi utilizada para quantificar fluoxetina e carbamazepina em animais bentônicos, utilizando 1,0 μL de amostra, que consistiu num extrato obtido a partir da maceração dos indivíduos. As taxas de recuperação do método para ambos os analitos foi superior a 85%, e os limites de detecção obtidos foram de 18 e 128 ng g^{-1} para carbamazepina e fluoxetina, respectivamente, valores pelo menos 50 vezes menores aos obtidos com LC-MS convencional.

Exemplificando análises de multicomponentes, Moreno-González et al. (2017) desenvolveram um método empregando nanoLC-MS para determinação de 64 pesticidas em amostras de alimentos de origem vegetal. O extrato final foi diluído numa proporção de 1:20 para posterior injeção de 1,0 μL no sistema cromatográfico. Foram obtidos limites de quantificação da faixa de 0,001 a 0,114 $\mu\text{g kg}^{-1}$ nas

matrizes de menor teor lipídico, valores muito menores do que os limites estabelecidos pela legislação vigente e que os limites de quantificação obtidos pelo LC convencional. Adicionalmente, o uso da nanoLC permitiu uma redução significativa dos efeitos de matriz devido à possibilidade de diluição da amostra sem comprometer a alta detectabilidade do método.

Visando a aplicação da nanoLC-MS à bioanálise, Alcántara-Durán et al. (2018) realizaram a determinação de drogas frequentemente utilizadas para aumentar o desempenho esportivo de atletas e drogas de abuso em amostras de urina. Neste método, as amostras foram diluídas numa proporção de 1:50 e injetadas diretamente no sistema cromatográfico, permitindo a minimização do efeito matriz e limites de detecção inferiores a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para 81 drogas, sendo que tais limites foram abaixo dos limites estabelecidos pela Agência Mundial Antidoping, demonstrando a detectabilidade característica desta técnica analítica.

Independentemente da técnica empregada na análise de uma amostra, ao se trabalhar com matrizes de alta complexidade é imprescindível a avaliação do preparo de amostra, pois os analitos podem estar presentes nestas amostras em concentrações muito baixas, de poucos ng mL^{-1} , de forma que a pré-concentração dos analitos se torna de alto interesse, e amostras mais complexas apresentam um maior número de componentes que podem atuar como interferentes, tanto na separação cromatográfica quanto na etapa de ionização no caso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

1.3 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostras consome grandes períodos de tempo, assim como está sujeito a uma maior incidência de erros quando comparado às outras etapas do método analítico. Sendo assim, a precisão e a exatidão do método são altamente dependentes desta etapa (CALDAS et al., 2011; MERIB; CARASEK, 2014).

Matrizes biológicas, como o plasma humano, apresentam alta complexidade, tornando a etapa de preparo de amostra crucial para o desenvolvimento do método analítico. Adicionalmente, devido ao alto teor proteico destas matrizes, a remoção de proteínas se torna crítica para a vida útil da coluna analítica, pois estas tendem a se

adsorver de forma irreversível na fase estacionária, afetando a reprodutibilidade das análises devido à perda de eficiência gradual da coluna (MULLETT, 2007).

De forma similar, a alta complexidade de uma amostra também pode constituir um desafio para a análise da mesma empregando espectrometria de massas devido ao efeito matriz. Assim, a presença de interferentes que são infundidos ou que, no caso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, coeluem com os analitos pode acarretar num aumento ou supressão da ionização do mesmo, processos que terão uma influência crítica na exatidão e precisão de um método analítico (VAN EECKHAUT et al., 2009; XU et al., 2007).

Dessa forma, devido à presença de muitos interferentes, principalmente macromoléculas que podem prejudicar outras etapas do método analítico, e a baixa concentração dos analitos nestas matrizes, a extração e pré-concentração dos analitos se torna essencial. As técnicas mais utilizadas com este propósito em matrizes biológicas são a extração líquido-líquido ("*Liquid-Liquid Extraction*" - LLE) e a extração em fase sólida ("*Solid Phase Extraction*" - SPE) (FARIA et al., 2017; JUROWSKI et al., 2017).

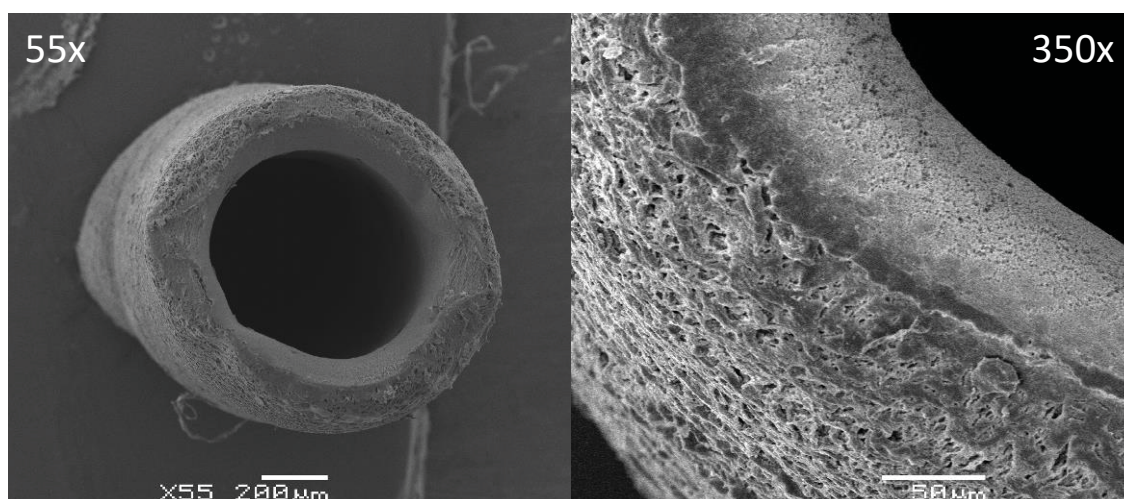
A LLE se baseia na partição de um composto em dois líquidos imiscíveis. A amostra é agitada na presença de um solvente extrator, imiscível no meio da amostra, formando duas fases, nas quais o analito estará distribuído de acordo com o seu coeficiente de partição. Esta técnica fornece recuperações altas, porém utiliza grandes volumes de solventes orgânicos e é considerada de difícil automação (MERIB; CARASEK, 2014; SKOOG et al. 2015). Por apresentar uma maior compatibilidade com a cromatografia líquida, esforços têm sido aplicados na miniaturização da LLE, em especial, para aplicação em matrizes biológicas, nos quais os volumes de amostras são muitas vezes bastante reduzidos.

A LLE pode ser miniaturizada dando origem às técnicas denominadas microextração em fase líquida ("*Liquid-Phase Microextraction*" - LPME), que combinam a extração dos analitos e sua pré-concentração numa única etapa, resultando num extrato pronto para ser analisado. Estas apresentam as vantagens de baixo consumo de solvente orgânico, são procedimentos rápidos, de fácil operação, menor custo, altas taxas de recuperação e altos fatores de enriquecimento. As três principais categorias de LPME são microextração de gota única ("*Single Drop Microextraction*" - SDME), microextração líquido-líquido dispersiva ("*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*" - DLLME) e microextração

líquida com fibra oca (*"Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction"* - HF-LPME) (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2015).

A HF-LPME foi desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999), onde, para realizar a extração, uma fibra oca porosa polimérica (FIGURA 5), usualmente de polipropileno, é utilizada como um suporte para um solvente orgânico imiscível em água, que por sua vez atuará como uma membrana líquida suportada (MLS). O interior da fibra, conhecido como lúmen, é então preenchido com uma fase aceptora, que pode ser orgânica ou aquosa, caracterizando HF-LPME de duas e três fases, respectivamente. Em seguida, a fibra é mergulhada na amostra contendo os analitos, geralmente aquosa, que atuará como a fase doadora. Dessa forma, os analitos migram da fase doadora para a MLS, e em seguida, da MLS para a fase aceptora, onde os analitos tendem a se concentrar devido à sua hidrofobicidade (modo duas fases) ou por possibilidade de controle de pH tanto da fase doadora quanto da fase aceptora (modo três fases) (GJELSTAD et al., 2012; SHARIFI; ABBASI, NOSRATI, 2015).

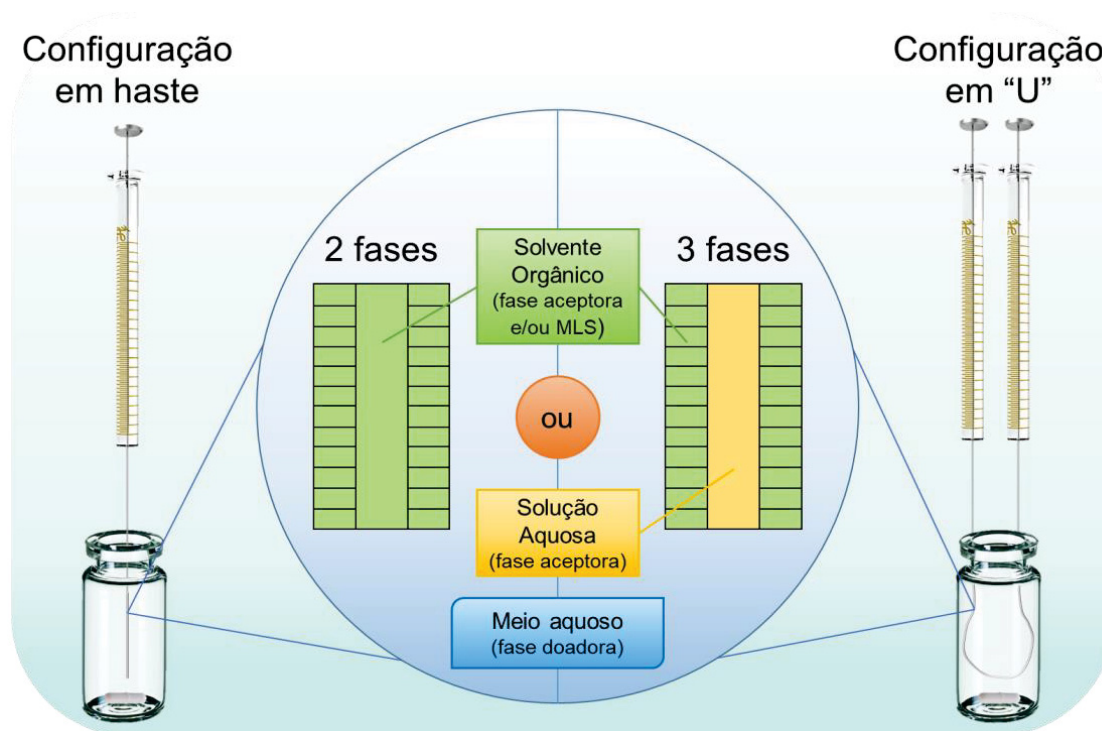
FIGURA 5 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SEGMENTO DE FIBRA OCA DE POLIPROPILENO



FONTE: Acervo CroMe (2017).

A HF-LPME pode ser empregada na configuração de haste, na qual a extremidade inferior é selada antes de se adicionar a fase aceptora e a extremidade superior permanece presa a uma seringa ou a uma ponteira, ou na configuração de U, onde ambas extremidades são presas a seringas ou ponteiras, como representado na FIGURA 6 (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

FIGURA 6 – ESQUEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA COM FIBRA OCA EM CONFIGURAÇÃO DE U



FONTE: A autora (2018).

Esta técnica de extração proporciona um fator de enriquecimento alto, devido à alta razão dos volumes de fase doadora e aceptora, sem a necessidade de etapas adicionais de pré-concentração. Outras vantagens da técnica são que esta utiliza pequenos volumes de solvente orgânico, apresenta alta eficiência de *clean-up*, pois os poros da fibra atuam como uma barreira física impedindo que macromoléculas permeiem até a fase aceptora, baixo custo, não há efeito de memória devido ao fato de que as fibras são descartáveis além de apresentar a possibilidade de automação. Tais características permitem o uso da fibra oca para a extração de analitos em matrizes de alta complexidade (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Em constraste, a técnica de HF-LPME apresenta algumas desvantagens, como o fato de ser um procedimento relativamente lento, onde cada extração usualmente dura cerca de 15 a 45 minutos, e ser um procedimento frequentemente realizado de forma manual, introduzindo um maior erro do analista quando comparada a técnicas de extração automatizadas (GJELSTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2013).

Ao se desenvolver um método analítico empregando HF-LPME diferentes parâmetros devem ser avaliados, como tipo de solvente, tempo de extração, força iônica, pH das fases doadora e aceptora, agitação e, em alguns casos, teor de solvente adicionado à amostra.

Como citado anteriormente, a utilização de um solvente imiscível com água como membrana líquida suportada é imprescindível para o desempenho da técnica, porém, este solvente também deve ser compatível com o material que constitui a fibra oca, visando uma forte imobilização nos poros da fibra, assim como apresentar uma baixa volatilidade, evitando sua evaporação durante o procedimento de extração. Os solventes mais utilizados com este propósito são 1-octanol, tolueno, clorofórmio e éter n-hexílico (SHARIFI et al., 2015).

Em relação ao tempo de extração, é característico da técnica de HF-LPME que o equilíbrio da extração seja atingido após um longo período de tempo, sendo que este aumenta conforme maior o volume de amostra empregado, podendo chegar a 2 horas quando 1 L de amostra é empregado. No entanto, ao se utilizar volumes pequenos de amostra, de até 2 mL, o equilíbrio é atingido em torno de 15 a 45 min (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). Além do volume de amostra, o tempo necessário para atingir o equilíbrio de extração é afetado pela velocidade de agitação, pois esta será responsável pelo transporte de massa na fase doadora, e pela viscosidade do solvente que compõe a MLS, uma vez que uma maior viscosidade resultará numa migração mais lenta do analito através da MLS e conseqüentemente, o equilíbrio será atingido mais lentamente (GJELSTAD et al., 2012; MOHAMED et al., 2017).

A eficiência de extração também é altamente dependente do pH da fase doadora, no caso da configuração de duas fases, e dos pHs das fases doadora e aceptora para o sistema de três fases. A fase doadora deve apresentar um valor de pH em que os analitos se encontrem majoritariamente na forma neutra, permitindo sua extração pelo solvente da MLS e, no caso da configuração de duas fases, posteriormente pela fase aceptora, de forma que para realizar a extração de analitos básicos o pH da fase doadora deve se encontrar básico, e no caso de analitos ácidos, o pH deve se encontrar ácido. Para um sistema de três fases, além de se controlar o pH da fase doadora, também é necessário controlar o pH da fase aceptora, de forma que o analito passe para a forma carregada, o que por sua vez o impedirá de retornar para a MLS (MERIB; CARASEK, 2014).

Como as demais técnicas de extração baseadas no princípio de partição, a extração de analitos hidrofóbicos por HF-LPME pode ser beneficiada pela adição de determinados sais à amostra, elevando a força iônica do meio. Este princípio é denominado *salting out*, onde o aumento da força iônica favorece a migração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica. Os sais responsáveis por tal efeito são compostos por ânions pequenos com alta densidade de carga, como o cloreto de sódio (HYDE et al., 2017).

Adicionalmente, ao se aplicar a técnica de HF-LPME para amostras biológicas ricas em proteínas, deve ser avaliada a adição de solvente orgânico miscível em água à amostra, visando o rompimento de possíveis ligações entre o analito e as proteínas presentes no meio. Para este fim, dentre os solventes que podem ser empregados estão metanol, acetona e acetonitrila (LI et al., 2015).

No trabalho de Horta et al. (2018) foi conduzida a determinação de três fármacos inibidores de bomba de prótons, como o omeprazol, em amostras de plasma humano empregando um método analítico baseado em HF-LPME e cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. A extração foi realizada empregando um sistema de três fases, onde a MLS consistiu em 1-octanol, fase aceptora de tampão borato pH 10,0 e fase doadora contendo 5% de cloreto de sódio (m/v) composta por 1,0 mL de plasma humano, 1,0 mL de metanol e 2,5 mL com tampão fosfato pH 5,0. Foram obtidos limites de quantificação de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os analitos, e as taxas de recuperação observadas foram de 3,47 a 30,6%.

Porto et al. (2012) utilizaram a HF-LPME com configuração em U para extrair três antidepressivos, citalopram, paroxetina e fluoxetina, de amostras de plasma humano, e análise por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Para realizar a extração, a amostra de plasma teve seu pH ajustado a 13,0 com NaOH, a membrana líquida suportada consistiu em éter diexílico e a fase aceptora composta por uma solução de HCl de pH 2,0. Os limites de quantificação do método doram de 2 a 5 ng mL^{-1} e as faixas dinâmicas lineares foram compatíveis com as concentrações plasmáticas deste fármaco, de forma que o método proposto pode ser aplicado em análises de rotina.

No trabalho de Sun, Qu e Du (2014) foi realizada a determinação naloxona, buprenorfina e norbuprenorfina em plasma humano empregando HF-LPME na configuração de haste e análise por LC-MS/MS. A MLS empregada consistiu numa mistura de 1-octanol, clorofórmio e tolueno (2:4:4), e esta mesma mistura foi utilizada

como fase aceitadora. O método apresentou limites de detecção e quantificação nas faixas de 0,025 a 0,05 e 0,05 a 0,1 ng mL⁻¹, respectivamente, assim como taxas de recuperação de 92 a 106%. Ao comparar a HF-LPME com a SPE, os autores afirmam que a fibra oca forneceu resultados com precisão e exatidão tão bons quanto a SPE, além de permitir uma redução equivalente a 50 vezes no volume de solvente orgânico necessário para o procedimento de extração, assim como reduções no tempo de preparo e no custo.

Na TABELA 3 é apresentado um levantamento de estudos realizados nos últimos anos envolvendo a determinação dos fármacos selecionados em amostras biológicas.

TABELA 3 – MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

continua							
Fonte	Matriz	Técnica analítica	Preparo de amostra	Faixa dinâmica linear (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
Carbamazepina							
a	Plasma	HPLC-UV	Precipitação de proteínas	100 - 50000	10	100	/
b	Plasma	HPLC-DAD	MEPS	100 - 15000	15	/	100
c	Plasma	LC-MS/MS	MEPS	500 - 10500	/	/	0,10
d	Sangue total	LC-MS/MS	DLLME	5 - 100	2	5	/
e	Plasma	LC-MS/MS	DPX	500 - 8500	/	/	0,5
Diazepam							
c	Plasma	LC-MS/MS	MEPS	50 - 850	/	/	0,05
d	Sangue total	LC-MS/MS	DLLME	5 - 100	2	5	/
e	Plasma	LC-MS/MS	DPX	50 - 1050	/	/	1,0
f	Plasma	LC-MS/MS	SPE	1 - 50	0,3	1	/
Fluoxetina							
c	Plasma	LC-MS/MS	MEPS	50 - 850	/	/	0,05
d	Sangue total	LC-MS/MS	DLLME	5 - 100	2	5	/
e	Plasma	LC-MS/MS	DPX	50 - 850	/	/	10,0
g	Plasma	LC-MS/MS	SPE	0,5 - 50	/	/	0,5
h	Plasma	LC-MS/MS	LLE	0,2 - 25	/	/	0,2
i	Plasma	HPLC-FLU	HF-LPME	5 - 500	/	/	5
j	Plasma	GC-MS	HF-LPME	10 - 500	3	10	/

continuação e conclusão

Haloperidol							
c	Plasma	LC-MS/MS	MEPS	0,5 - 40,5			0,05
d	Sangue total	LC-MS/MS	DLLME	5 - 100	2	5	
e	Plasma	LC-MS/MS	DPX	0,5 - 40,5			0,5
f	Plasma	LC-MS/MS	SPE	1 - 50	0,3	1	
Trimetoprima							
k	Plasma	LC-MS/MS	SPE	30 - 30000			30
l	Plasma	HPLC-UV	EME	200 - 2000	16	26	

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, DPX - Extração sortiva com ponteira descartável, EME – Extração em eletromembrana, GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, HF-LPME – Microextração em fase líquida com fibra oca, HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, HPLC-FLU - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, HPLC-UV - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta, LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, LLE – Extração líquido-líquido, LLOQ – Limite inferior de quantificação, LOD – limite de detecção, LOQ – limite de quantificação, MEPS - Microextração por sorvente empacotado, SPE – Extração em fase sólida.

FONTE: a - Serralheiro et al. (2013), b - Ferreira, A. et al. (2014), c - Souza et al. (2015), d - Fisichella et al. (2015), e - Pinto et al. (2017), f - Zhang et al. (2018), g - Bonde et al. (2014), h - Ni et al. (2018), i - Freitas et al. (2010), j - Oliveira et al. (2013), k - Mistri et al. (2010), l - Huang et al. (2016).

Unindo as vantagens da técnica de HF-LPME, como alta eficiência de *clean-up*, baixo custo e alto fator de pré-concentração, e da análise por nanoLC-MS, como baixo volume de amostra necessário, baixos limites de detecção e alta confiabilidade na identificação dos analitos, teria-se como resultado um protocolo analítico ideal para matrizes biológicas. No entanto, até o momento não há a descrição de uma metodologia empregando estas técnicas em conjunto na literatura, para nenhum tipo de matriz ou analito, criando um espaço para novas investigações em Química Analítica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico empregando microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (nanoLC-MS) para determinação simultânea dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em plasma humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver o método cromatográfico (nanoLC-MS) para a determinação de carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima;
- Otimizar as condições de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para os fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima;
- Avaliar os principais parâmetros de desempenho do método desenvolvido em amostras de plasma humano;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de plasma de pacientes em terapia com estes fármacos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

As soluções estoque dos analitos e do padrão interno foram preparadas individualmente em metanol (grau HPLC) na concentração de $1,00 \text{ g L}^{-1}$, e posteriormente foram armazenadas em tubos de ensaio envoltos em papel alumínio, para evitar exposição à luz, a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, condição em que as soluções padrão permanecem estáveis (BINSUMAIT ET AL., 2001; LE-MINH ET AL., 2012; MAHJOUR; STAUB, 2000; QUEIROZ et al., 2008; SUTHERLAND et al., 2001). Os padrões de alta pureza de carbamazepina, diazepam, haloperidol e cloridrato de fluoxetina foram adquiridos da United States Pharmacopeia, USP (São Paulo, Brasil), e o padrão farmacêutico (>98%) de trimetoprima foi fornecido pelo laboratório farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Estes padrões foram cedidos para o desenvolvimento deste trabalho pelo Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora, do DQui-UFPR. O padrão interno utilizado na etapa de avaliação dos parâmetros de desempenho do método, a fluoxetina-D6 $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, foi adquirida da Cerilant (Paris, França).

Para o preparo das fases móveis da cromatografia foi utilizada acetonitrila, grau LC-MS (Merck, São Paulo, Brasil), água ultrapura purificada por sistema Milli-Q, Millipore® (São Paulo, Brasil), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega$, e ácido fórmico padrão analítico (Merck, São Paulo, Brasil).

As fases doadoras utilizadas no procedimento de extração foram preparadas por diluição a partir de hidróxido de amônio padrão analítico (Biotec, Pinhais, Brasil). Os valores de pH foram verificados com auxílio de um pHmetro Micronal C474. Os demais reagentes utilizados na etapa de extração, como metanol e acetona grau HPLC (J.T. Baker, E.U.A), assim como 1-octanol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio, foram de grau analítico.

3.2 AMOSTRAS DE PLASMA

A otimização das condições da extração foi realizada empregando amostras de plasma humano isentas dos analitos e fornecidas pelo Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFPR. O uso de tais amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Saúde da Universidade Federal do Paraná e pelo

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ), como explícito nos APÊNDICES 1 e 2, respectivamente.

A coleta destas amostras foi realizada utilizando seringas de 10,0 mL e, posteriormente, o sangue total foi transferido para tubos de coleta BD Vacutainer SST que contém um gel separador, de forma que ao se centrifugar as amostras de sangue, a fração coagulada do sangue se deposita no fundo do tubo, o plasma se comporta como sobrenadante, e o gel reside entre estas duas frações. As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm por 10 min, e o plasma foi coletado e transferido para tubos falcon. Em seguida, amostras provenientes de diversos voluntários foram misturadas, formando *pools* de plasma isento dos analitos, que foram utilizados no estudo de otimização dos parâmetros da extração e futuramente utilizados na etapa de validação analítica.

A amostra proveniente do voluntário foram coletadas seguindo o mesmo procedimento que as amostras de plasma isento dos analitos. O voluntário assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1), assentindo sua participação na pesquisa conduzida.

3.3 CONFECÇÃO DAS NANOCOLUNAS ANALÍTICAS

As nanocolunas analíticas empregadas nas análises por nanoLC-MS foram produzidas na Plataforma de Espectrometria de Massas, localizada no Instituto Carlos Chagas, empregando capilares de sílica recoberta com diâmetro interno 75 μm e diâmetro externo 375 μm (Polymicro Technologies). Um capilar com cerca de 8 cm a mais do que o tamanho desejado da coluna, usualmente de 23 cm, foi cortado com o auxílio de um cortador de coluna capilar. Em seguida, este capilar foi queimado cuidadosamente com auxílio de um isqueiro a 8 cm da sua ponta e posteriormente limpo com metanol, para que a cobertura de poli-imida fosse removida e, conseqüentemente o capilar pudesse ser cortado pelo laser. O capilar foi preso no Laser-Based Micropipette Puller P-2000 (Sutter Instrument Company), equipado com um laser pulsante de CO_2 que realizou o corte, dando origem a ponta da coluna. O laser foi pulsado quatro vezes sobre a seção descoberta do capilar, de acordo com o apresentado na TABELA 4, cortando o capilar e gerando a ponta da coluna.

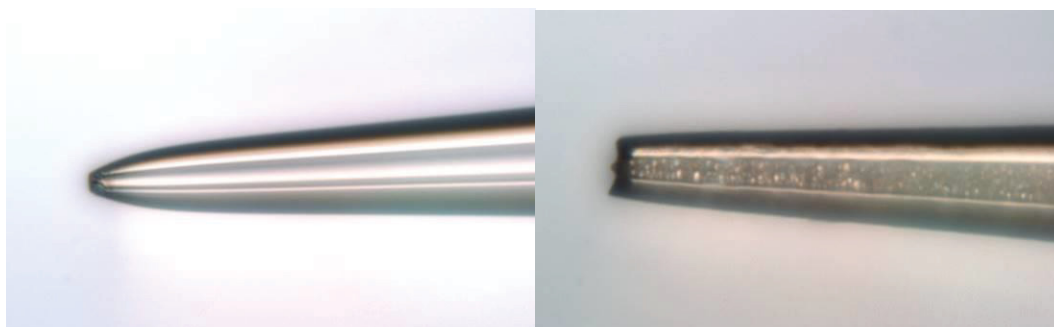
TABELA 4 – PROGRAMAÇÃO PARA CONFECÇÃO DA PONTA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

Ciclo	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
1	250	0	30	200	0
2	270	0	30	200	0
3	245	0	32	200	0
4	220	0	17	200	0

Heat: energia fornecida pelo laser; Filament: padrão de escaneamento do laser sobre o capilar; Velocity: velocidade em que são puxados os suportes que prendem o capilar; Delay: diferença de tempo entre o término do pulso do laser e o início da tração dos suportes; Pull: tração do suporte. Observação: todas as variáveis são adimensionais.

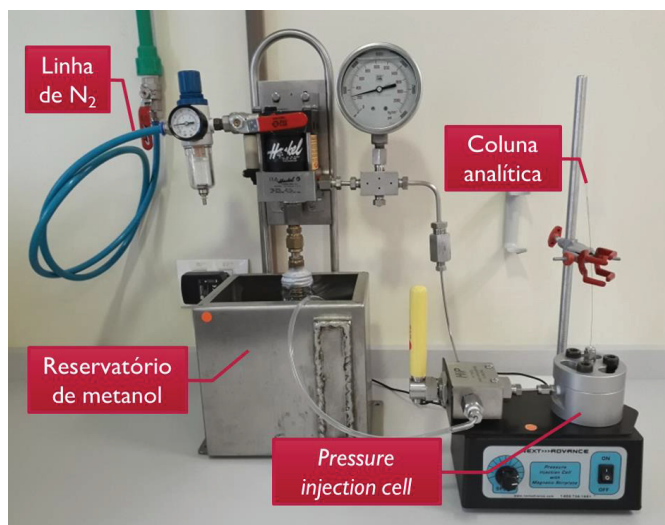
A abertura da ponta da coluna foi verificada sob microscópio óptico, como apresentado na FIGURA 7. Nos casos em que a ponta não estava aberta, a coluna foi raspada com uma lâmina de cerâmica. Para confeccionar uma coluna de 15 cm, o capilar deve ser preenchido com 20,0 mg de C18 de 2,4 μm ou 3,0 μm e porosidade de 120 Å (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH), pesados em balança analítica. A coluna foi conectada a *pressure injection cell* contendo as partículas de C18, que por sua vez foi conectada a uma bomba pneumohidráulica, como o esquema apresentado na FIGURA 8. O sistema foi pressurizado até 5000 psi, e mantido sob pressão até que o acúmulo de partículas atingisse a marca dos 15 cm. Em seguida, a coluna foi desconectada deste sistema e empacotada em cromatógrafo a líquido (Eksigent nanoLC Ultra 1D Plus) seguindo os ciclos representados na TABELA 5, onde a fase A foi composta de uma solução 0,10% (v/v) de ácido fórmico em água ultrapura, e fase B foi composta de uma solução 0,10% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila.

FIGURA 7 – PONTA DA COLUNA ANALÍTICA (A) ANTES DO PREENCHIMENTO E SEM RASPAGEM E (B) PREENCHIDA COM C18 DE 2,4 μm E APÓS RASPAGEM



FONTE: A autora (2017).

FIGURA 8 – PREENCHIMENTO DA COLUNA COM AS PARTÍCULAS DE C18 EM SISTEMA PRESSURIZADO



FONTE: A autora (2018).

TABELA 5 – PROGRAMA DE EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS ANALÍTICAS

Ciclo	Tempo (min)	Vazão Fase A (nL min ⁻¹)	Vazão Fase B (nL min ⁻¹)
1	0	0	500
3	7,2	0	500
4	7,2	0	1000
5	15,2	0	1000
6	15,2	1000	0
7	16,8	1000	0
8	16,8	500	0
10	34,6	500	0
11	34,6	0	500
13	39,5	0	500
14	39,5	0	1000
15	47,5	0	1000
16	47,5	1000	0
17	49,1	1000	0
18	49,1	500	0
20	66,9	500	0
21	66,9	0	500
22	71,8	0	500
23	71,8	0	1000
24	79,8	0	1000
25	79,8	1000	0
26	81,4	1000	0
27	81,4	500	0
28	99,2	500	0
29	99,2	250	0
30	114,2	250	0
31	114,2	0	250
32	129,2	0	25

3.4 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO

3.4.1 Estudos de Ionização dos Analitos

Foram realizados estudos de fragmentação dos analitos a partir da infusão direta dos mesmos empregando o espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo e tempo de voo Micromass Q-ToF micro (Waters®, MassLynx V4.1) utilizando uma fonte de ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+). Inicialmente, foram analisados apenas os fragmentos a partir da infusão no modo ToF-MS, onde é realizada a varredura dos íons. Uma seringa de 250 µL foi preenchida com soluções dos analitos individuais em água:acetonitrila 1:1 (v/v) com concentração de 1,0 mg L⁻¹ na presença ácido fosfórico 0,10% (v/v), aditivo que favorece a protonação dos analitos infundidos. A infusão foi realizada com vazão de 10 µL min⁻¹, e a aquisição dos espectros foi feita durante 2 min. A temperatura da fonte de ionização foi fixada em 100 °C. Os parâmetros foram avaliados de acordo com o representado na TABELA 6. Após a escolha dos parâmetros ideais, foram realizadas cinco aquisições consecutivas dos espectros dos analitos para verificar a reprodutibilidade do espectro nas condições escolhidas. As calibrações do instrumento foram feitas pela infusão de ácido fosfórico 0,10% (v/v) em água:acetonitrila (1:1, v/v).

TABELA 6 – PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ANALITOS

Parâmetros	Faixas avaliadas
Voltagem capilar (V)	2500 – 4000
Voltagem cone de amostragem (V)	15 – 25
Voltagem cone de extração (V)	0,0 – 3,0
Temperatura de dessolvatação (°C)	100 - 250

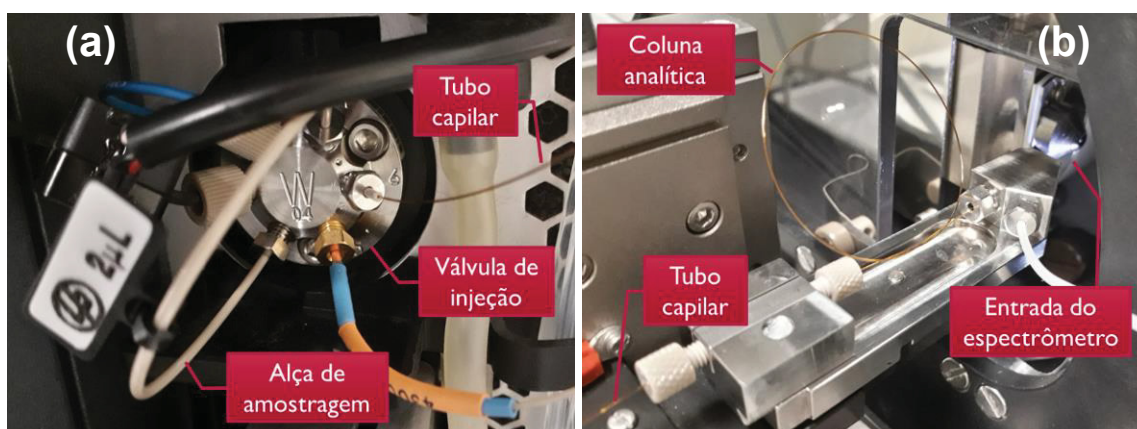
3.4.2 Método Cromatográfico

A partir de parceria estabelecida entre o grupo de pesquisa e a Fiocruz (Instituto Carlos Chagas – Curitiba/PR), foi empregado inicialmente um sistema nanoLC-MS/MS, que consiste em um cromatógrafo a líquido de ultraperformance NanoACQUITY e espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo e tempo de

voos (“Nano-Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight”, nanoLC-QToF - Waters®, MassLynx V4.1).

Para permitir o uso da coluna analítica confeccionada no laboratório e minimizar o volume morto entre a coluna e o espectrômetro, foi estabelecida uma conexão da válvula de injeção no nanoLC até a entrada da coluna analítica utilizando um capilar de sílica vazio, e a coluna cromatográfica foi colocada diretamente na entrada do espectrômetro de massas, formando um *loop*, como mostrado na FIGURA 9.

FIGURA 9 – nanoLC-MS, ONDE (a) VÁLVULA DE INJEÇÃO E (b) COLUNA ANALÍTICA NA ENTRADA DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS



FONTE: A autora (2018).

Nos testes iniciais foi utilizado um método baseado no descrito por Berlioz-Barbier et al. (2015), com uma vazão de 300 nL min^{-1} e volume de amostra de $5 \mu\text{L}$, seguindo o gradiente apresentado na TABELA 7, onde a fase A é composta de uma solução 0,10% (v/v) de ácido fórmico em água ultrapura, e fase B é composta de uma solução 0,10% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila. Todos os experimentos foram realizados no modo *fullscan* com aquisição dos espectros no modo ToF-MS realizando a varredura de 40 a 600 m/z.

TABELA 7 – GRADIENTE UTILIZADO NOS TESTES PRELIMINARES NO nanoLC-MS

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	99,0	1,0
20,00	99,0	1,0
20,01	67,0	33,0
25,01	20,0	80,0
40,01	20,0	80,0
40,02	67,0	33,0
60,02	67,0	33,0

Diferentes métodos de eluição foram avaliados, compreendendo quatro etapas: *trapping* (onde a amostra é arrastada da alça de amostragem até a coluna cromatográfica), separação cromatográfica, limpeza e reequilíbrio da coluna cromatográfica. Para isto, foram empregadas fases móveis baseadas em água e acetonitrila, com proporções variando de 30:70 a 80:20 (v/v) de acetonitrila:água, e empregando ácido fórmico como aditivo na concentração de 0,10% (v/v).

3.4.3 Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca

Uma fibra oca porosa de polipropileno (Q3/2 Accurel) com diâmetro interno de 600 μm , espessura da parede de 200 μm e tamanho de poros de 0,2 μm , adquiridas pelo fornecedor Membrana® (Wuppertal, Alemanha), foi cortada em pedaços de tamanho adequado, variando de 5 a 8 cm, para o procedimento de extração empregando um *vial* de 10,0 mL. Para etapa de limpeza das fibras, estas foram mergulhadas em acetona e agitadas em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, a fibra foi removida da acetona e seca em atmosfera ambiente.

Para o condicionamento da fibra, esta foi mergulhada no solvente orgânico que comporia a MLS (1-octanol ou hexano), e agitada em vórtex durante 30 s, com suas extremidades abertas. A fibra foi retirada do solvente, conectada a duas microseringas de LC de 25 μL e preenchida com 20 μL da fase aceptora escolhida.

Este sistema foi fixado a um suporte de garras, de forma que a fibra oca estivesse completamente mergulhada na amostra, de volume final de 10,0 mL, e não entrasse em contato com o agitador magnético. O frasco foi selado com um pedaço de Parafilm M (Prolab, São Paulo), para minimizar a volatilização do hidróxido de amônio. Após a extração, as seringas foram removidas do suporte, e a fase aceptora foi recolhida e transferida para um *vial* de 1,0 mL. O extrato foi seco com uma bomba a vácuo e ressolubilizado em uma solução de ácido fórmico 0,10% (v/v) em água ultrapura para posterior injeção no nanoLC-MS, a um volume de 100 μL e 1,0 mL nos ensaios de otimização dos parâmetros de extração e de avaliação preliminar dos parâmetros de desempenho, respectivamente.

A seleção entre o sistema de duas ou três fases foi realizada empregando como amostra 10,0 mL de solução de hidróxido de amônio pH 10,0, devido à indisponibilidade de plasma humano branco no momento da realização deste teste.

Os demais parâmetros de extração foram otimizados de forma univariada, de acordo com o apresentado na TABELA 8. Nesta etapa, foram empregados 250 µL de plasma humano branco, diluídos para um volume final de 10,0 mL.

TABELA 8 – PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ANALITOS

Parâmetros	Condições avaliadas
pH da fase doadora	7, 8, 9, 10 e 11
Agitação (rpm)	0, 750, 1000 e 1250
Tamanho da fibra (cm)	5, 6, 7 e 8
Tempo de extração (min)	10, 20, 30 e 45
Teor de cloreto de sódio (% (m/v))	0, 5, 10, 20 e 30
Teor de metanol (% (v/v))	0, 5, 10, 25 e 50

A otimização univariada foi realizada empregando concentrações distintas para os analitos, com o objetivo de observar a melhor condição de extração dentro da faixa de concentração terapêutica, que por sua vez apresenta uma grande variabilidade entre os fármacos selecionados para este estudo. Tais informações se encontram na TABELA 9.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES TERAPÊUTICAS E AVALIADAS POR HF-LPME PARA OS ANALITOS

Fármaco	Faixa de concentração terapêutica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	Concentração utilizada na otimização da HF-LPME ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carbamazepina (CBZ)	2 - 8	2
Diazepam (DZP)	0,1 - 2	0,2
Fluoxetina (FXT)	0,12 - 0,5	0,2
Haloperidol (HLP)	0,001 - 0,02	0,02
Trimetoprima (TMP)	1,5 - 2,5	2

FONTE: a - SCHULZ et al. (2012)

3.5 TRANSPOSIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA SISTEMA ANALÍTICO DISTINTO

Nesta etapa do trabalho foram necessárias várias modificações, como o aumento do diâmetro da partícula de C18 utilizada na confecção da coluna de cromatográfica 2,4 µm para 3,0 µm e o equipamento empregado nas análises, que consistiu de um cromatógrafo a líquido de ultraperformance, EASY-nLC 1000, e espectrômetro de massas híbrido do armadilha de íons linear e Orbitrap, LTQ Orbitrap XL (Thermo®, TraceFinder V4.1). Tais modificações foram necessárias devido à uma série de entupimentos durante o empacotamento das colunas com

partículas de C18 com diâmetro de 2,4 μm , juntamente a quebra do autoamostrador do nanoAcquity e impossibilidade de conserto imediato. Como consequência, o método cromatográfico desenvolvido passou por uma etapa de ajuste anterior aos ensaios de avaliação inicial de parâmetros de desempenho do método desenvolvido, como detalhado nos próximos tópicos. Nesta nova configuração, manteve-se a posição da coluna diretamente em frente a entrada do espectrômetro de massas, como representado na FIGURA 10.

FIGURA 10 – COLUNA ANALÍTICA EM FRENTE À ENTRADA DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS LTQ Orbitrap XL[®]



FONTE: A autora (2019).

3.5.1 Estudos de Ionização e Fragmentação dos Analitos

Visando a obtenção de uma eficiência de ionização máxima, a voltagem de spray foi otimizada a partir da injeção de soluções mix para os analitos e padrão interno, numa concentração de 20 ng mL^{-1} , sendo avaliadas as energias de 2500, 2750, 3000, 3250 e 3500 V.

Em relação ao estudo de fragmentação, foram avaliadas diferentes energias de colisão normalizadas na faixa de 0 a 30% para dissociação induzida por colisão (“*Collision Induced Dissociation*” – CID), utilizada na fragmentação no analisador de massas armadilha de íons linear, e de 0 a 72 % para dissociação induzida por colisão de alta energia (“*High-energy Collision Dissociation*” – HCD), empregada na fragmentação dos íons no analisador de massas Orbitrap. Estes dados foram

obtidos a partir da infusão de uma solução mix contendo os analitos e o padrão interno a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em meio de metanol:água 1:1 (v/v), utilizando ácido fórmico como aditivo a um teor de 0,10% (v/v).

3.5.2 Ajuste do Método Cromatográfico

A partir do método cromatográfico desenvolvido anteriormente, foram realizados ajustes na maioria das etapas descritas, exceto na etapa de *trapping* da amostra.

Para ajustar a etapa de separação dos analitos foram avaliadas diferentes eluições de 15 min, consistindo em sete eluições isocráticas empregando fases móveis com teores de acetonitrila de 50 a 80 % (v/v) e quatro eluições empregando gradientes de fase móvel, com teores iniciais de acetonitrila de 10 a 40 % (v/v) e teor final de acetonitrila de 100 % (v/v).

Para realizar tais testes foram utilizados os parâmetros do espectrômetro de massas conforme apresentado na TABELA 10, estabelecidos de acordo os métodos previamente desenvolvidos neste equipamento, empregando a maior resolução de massa disponível, de 60000, e a uma faixa de razão massa/carga que abrange os valores esperados para os íons dos analitos.

TABELA 10 – PARÂMETROS INICIAIS DE AQUISIÇÃO MS1 (FULLSCAN) NO ORBITRAP

Parâmetro	Faixa
Resolução de massa	60000
Razão massa/carga	80 - 400
Tempo de acumulação	10000 ms
Contagem de íons	1000000

3.5.3 Parâmetros de Aquisição do Espectrômetro de Massas

As aquisições foram realizadas por varredura no Orbitrap, visando a obtenção de espectros de massa exata contendo o perfil isotópico dos analitos, caracterizando a aquisição MS1. Esta aquisição será empregada na quantificação dos analitos, assim como na sua identificação. A TABELA 11 apresenta os parâmetros de aquisição desta etapa.

TABELA 11 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO MS1 (FULLSCAN) NO ORBITRAP

Parâmetro	Faixa
Resolução de massa	30000
Razão massa/carga	80 - 400
Tempo de acumulação	12,5 ms
Contagem de íons	50000

Em uma mesma corrida cromatográfica também foram realizadas aquisições de espectros resultantes da fragmentação dos íons moleculares protonados dos analitos, visando a obtenção de identificação mais completa e confiável dos analitos. Para obtenção destes espectros MS2, os íons foram isolados, fragmentados e analisados pela armadilha de íons linear, de acordo com os parâmetros apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO MS2 (FULLSCAN) NA ARMADILHA DE ÍONS LINEAR

Parâmetro	Faixa					
Tempo de acumulação	10 ms					
Contagem de íons	30000					
	CBZ	DZP	FXT-D6	FXT	HLP	TMP
Energias de colisão normalizadas (CID):	20	25	17	15	18	24
Faixa de razão massa/carga	55 - 250	65 - 300	75 - 330	75 - 325	90 - 390	70 - 305

CID – Dissociação induzida por colisão; CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT-D6 – fluoxetina-D6; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

3.6 AVALIAÇÃO INICIAL DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO

3.6.1 Curva analítica

As curvas analíticas foram construídas empregando o método de extração com as condições de compromisso, contemplando-se as concentrações plasmáticas de 0,02, 0,06 0,25, 0,50, 0,75, 1,5 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os fármacos selecionados para este estudo. Nesta etapa, o padrão interno fluoxetina-D6 foi adicionado as amostras de plasma a uma concentração de 0,025 ng mL^{-1} para o volume final de 10,0 mL de amostra. Após a secagem dos extratos, as amostras foram ressolubilizadas utilizando 1,0 mL de ácido fórmico 0,10% (v/v) em água ultrapura.

3.6.2 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método desenvolvido foram avaliadas a partir da obtenção das curvas analíticas, como descrito acima, em quintuplicata para a fluoxetina e em triplicata para os demais analitos. Para precisão, foi calculado o desvio padrão relativo para todos os pontos da curva, e para exatidão, as respostas médias para cada ponto foram interpoladas nas equações de reta obtidas.

3.6.3 Seletividade e especificidade

Para os estudos de seletividade foram conduzidas extrações em quintuplicata de plasma humano branco fortificado com o padrão interno, fluoxetina-D6, a uma concentração de 0,025 ng mL⁻¹ no volume final de 10,0 mL de amostra.

Já os estudos de especificidade foram realizados fortificando-se o plasma humano branco com os analitos, a uma concentração de 0,10 µg mL⁻¹ e com os possíveis interferentes ácido acetilsalicílico, amoxicilina, cafeína, colesterol, diclofenaco, ibuprofeno, lamivudina, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, paracetamol, progesterona, reserpina, sulfametoxazol e testosterona a 0,10 µg mL⁻¹, e canabidiol, 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol, estriol, estrona e THC (tetraidrocanabinol) a 0,20 µg mL⁻¹, cujas alíquotas foram cedidas por diferentes laboratórios de pesquisa do Departamento de Química da UFPR. O padrão interno foi adicionado na concentração de 0,025 ng mL⁻¹ para o volume final de 10,0 mL de amostra.

3.6.4 Recuperação e fator de enriquecimento

Para avaliar a recuperação e fator de enriquecimento foram aplicadas as relações descritas para um sistema de duas fases no estudo de Ho et al., (2002a) e representadas abaixo:

$$R = \frac{100n_{\text{eq,org}}}{C_i V_d} = \frac{K_{\text{org/d}} V_{\text{org}}}{K_{\text{org/d}} V_{\text{org}} + V_d} \cdot 100 \quad (1)$$

$$E = \frac{C_{\text{org}}}{C_i} = \frac{V_d R}{100 V_{\text{org}}} \quad (2)$$

onde: R – taxa de recuperação;

$n_{eq,org}$ – quantidade do analito extraída pela fase acceptora na condição de equilíbrio;

C_i – concentração inicial do analito na fase doadora;

C_{org} – concentração final do analito na fase acceptora;

V_d – volume da fase doadora;

V_{org} – volume da fase acceptora;

$K_{org/d}$ – coeficiente de partição do analito entre fases acceptora e doadora;

E – fator de enriquecimento.

Para aplicar estas equações ao método desenvolvido, aproximou-se a fase doadora, composta 95% (v/v) de fase aquosa (água e plasma) e 5% (v/v) de fase orgânica (metanol), para 100% (v/v) de água, permitindo considerar $K_{org/d}$ como o coeficiente de partição octanol-água dos analitos. Para os demais valores, considerou-se V_d como 10,0 mL, correspondendo ao volume final da fase doadora, e V_{org} como 17 μ L, que corresponde ao volume interno de um segmento de fibra oca com 6 cm de comprimento, que, por sua vez, corresponde ao volume coletável da fase acceptora na HF-LPME com sistema de duas fases.

3.6.5 Diluição da amostra

Com o intuito de se avaliar a possibilidade de diluição da amostra antes do procedimento de extração, alíquotas 50 μ L de plasma humano branco foram fortificadas com 5,0 mg L⁻¹ dos analitos, representando a diluição 1:4 da amostra de plasma. Tais amostras foram avolumadas a 10,0 mL a partir da adição de 9,45 mL de hidróxido de amônio pH 10,0, 500 μ L de metanol e 1,0 g de cloreto de sódio. O restante do procedimento de extração foi realizado conforme o descrito na seção 3.4.3. Os extratos finais foram ressolubilizados utilizando 1,0 mL de ácido fórmico 0,10% (v/v) em água ultrapura e injetados no sistema cromatográfico.

3.6.6 Aplicação do método a amostra de paciente em terapia com fluoxetina

O método desenvolvido e otimizado foi aplicado à amostra de um voluntário em terapia com 20 mg diárias de fluoxetina. A amostra foi coletada 14 horas após a

administração do fármaco, de acordo com a metodologia descrita na seção 3.2, e posteriormente processada e analisada dentro de 24 horas.

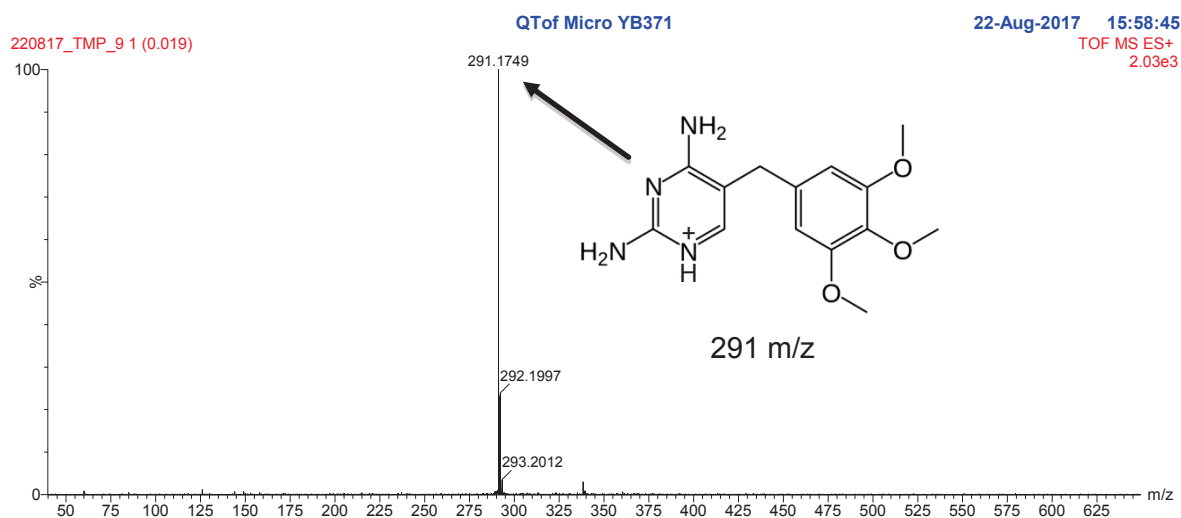
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO

4.1.1 Estudos de Ionização dos Analitos

Com o intuito de otimizar o processo de ionização dos analitos, visando uma maior eficiência de ionização foram avaliados alguns parâmetros como voltagem do capilar, voltagem dos cones de amostragem e extração, e temperatura de dessolvatação. Através da infusão dos analitos no espectrômetro de massas foi possível observar que, para alguns dos fármacos, a ionização por eletrospray forneceu apenas o íon molecular no espectro, como no caso da trimetoprima, cujo espectro está representado na FIGURA 11.

FIGURA 11 – ESPECTRO DA TRIMETOPRIMA - MODO ToF-MS



FONTE: A autora (2017).

É possível observar o íon de razão massa/carga 291, correspondente ao íon molecular protonado $[M+H^+]$, juntamente com fragmentos menos intensos no seu *cluster* isotópico ($m/z = 292$ e 293). No espectro também é observado um fragmento de relação massa/carga 338, de baixa intensidade, referente ao interferente erucamida, comum em análises com espectrometria de massas devido ao seu uso como agente deslizante em ponteiros de plástico e outros instrumentos laboratoriais. Este perfil é esperado para espectros obtidos por ESI, pois está é uma fonte de ionização branda, de forma que a energia fornecida nem sempre resultará na

fragmentação das moléculas infundidas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; VAIKKINEN et al., 2015).

Foram consideradas como condições ótimas de ionização aquelas que resultaram numa alta eficiência de ionização sem que houvesse uma diminuição na intensidade do íon molecular protonado, visando o desenvolvimento de um método com alta detectabilidade. Estas condições estão representadas na TABELA 13.

TABELA 13 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS UNIVARIADAMENTE

Parâmetros	Psicotrópicos e Antibióticos
Voltagem capilar (V)	3500
Voltagem cone de amostra (V)	25
Voltagem cone de extração (V)	2,0
Temperatura de dessolvatação (°C)	250

Para todos os analitos, fazendo o uso destes parâmetros foram obtidos espectros reprodutíveis e com o mesmo perfil, ou seja, mesma intensidade relativa dos íons formados, até concentrações em nível de 5,0 ng mL⁻¹. Os fragmentos obtidos para todos analitos estão listados na TABELA 14.

TABELA 14 – FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS DOS ANALITOS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Fármaco	Íons mais intensos (m/z)	
	1	2
Trimetoprima (TMP)	291	-
Carbamazepina (CBZ)	237	194
Haloperidol (HLP)	376	358
Diazepam (DZP)	285	-
Fluoxetina (FXT)	310	148

4.1.2 Otimização do Método Cromatográfico

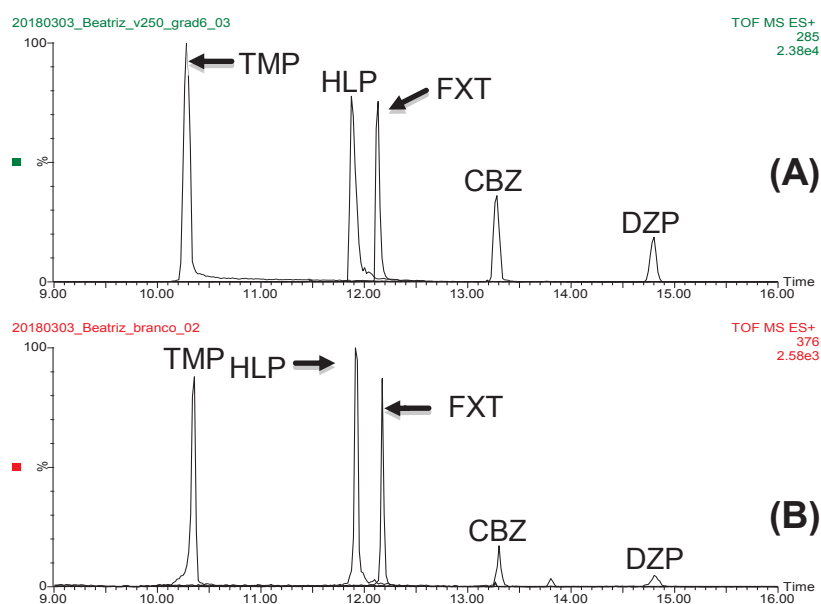
Com base no método inicial, foram avaliadas quatro vazões de fase móvel diferentes: 150, 200, 250 e 300 nL min⁻¹. Apesar do uso de vazões maiores resultar em menores tempos de retenção dos analitos, a vazão de 300 nL min⁻¹ resultou numa pressão elevada, cerca de 450 bar. Dessa forma, visando uma maior vida útil para as colunas, escolheu-se trabalhar com a vazão de 250 nL min⁻¹, para a qual a pressão máxima observada foi de 300 bar.

O volume de injeção é dependente do volume do *loop* de amostragem, uma vez que o modo de injeção conhecido como *full loop* fornece uma maior precisão e exatidão desta etapa. Neste modo de injeção é aspirado um volume em excesso em

relação ao volume do *loop*, garantindo que todo o *loop* seja preenchido com a amostra. Quando a válvula de injeção troca da posição de carregar o *loop* para a posição de injeção, todo o volume de amostra contido no *loop* é arrastado para a coluna (NAZARIO et al., 2017).

Dessa forma, dentre os *loops* disponíveis, de 2, 5 e 10 μL , escolheu-se trabalhar com o *loop* de 2 μL , pois quanto menor o volume de amostra, menor o tempo necessário para realizar o *trapping* da mesma. Adicionalmente, a coluna analítica capilar apresenta uma menor quantidade de fase estacionária em relação a coluna de LC convencional, tornando a coluna mais facilmente saturável, de forma que a quantificação de amostras contendo concentrações mais elevadas, em nível de $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de volumes de injeção maiores seria prejudicada. Na FIGURA 12, onde são representados cromatogramas referentes à injeção de 5 μL de solução padrão na concentração de 100 ng mL^{-1} , é possível observar um encaudamento dos picos cromatográficos, perfil característico da saturação da fase móvel, assim como efeito de memória como consequência da saturação, no qual os picos residuais na corrida da prova em branco representam de 3,4 a 9,4% da área do pico na corrida com os padrões dos analitos.

FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO DEMONSTRANDO SATURAÇÃO DA COLUNA ANALÍTICA, ONDE (A) ENCAUDAMENTO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DA SOLUÇÃO PADRÃO (100 ng mL^{-1}) A PARTIR DA INJEÇÃO DE 5 μL E (B) EFEITO DE MEMÓRIA OBSERVADO NA CORRIDA DA PROVA EM BRANCO SUBSEQUENTE – MODO TOF-MS



Fullscan – modo de aquisição varredura; EIC – Cromatograma de íon extraído; TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2018).

Em seguida, o tempo de *trapping* foi selecionado com base no volume de amostra injetado. Ou seja, para que um volume de 2 μL seja transferido da alça de amostragem para a coluna a uma vazão de 250 nL min^{-1} são necessários 8 minutos. Assim, a etapa de *trapping* foi realizada empregando fase móvel de composição de 1:99 (v/v) de acetonitrila:água, permitindo que os analitos fossem arrastados até o início da nanocoluna sem que ocorresse a eluição dos mesmos.

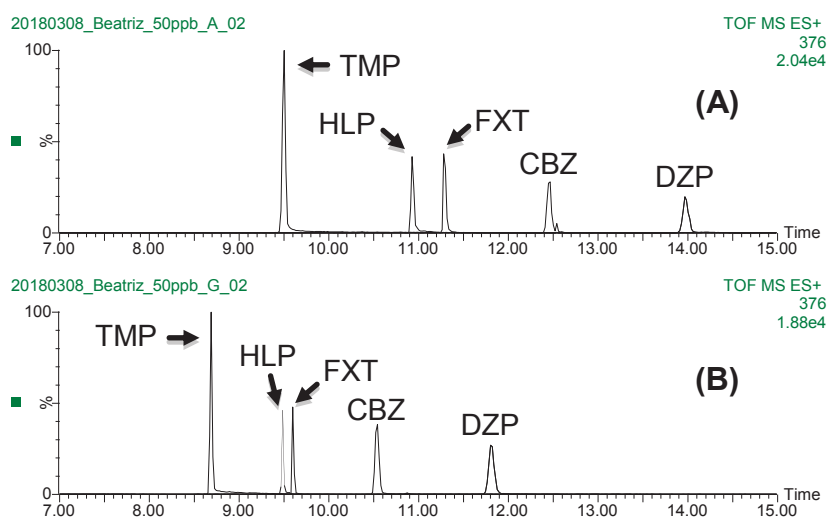
A separação cromatográfica foi avaliada em cinco gradientes e um método isocrático. Para os métodos com eluição por gradiente, a primeira etapa consiste na variação da composição da fase móvel num gradiente de 6 min, partindo de uma condição inicial de 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 ou 70:30 acetonitrila:água (v/v) até uma condição final de 80:20 acetonitrila:água (v/v). Numa segunda etapa, manteve-se a condição final do gradiente por 9 min. Já o método isocrático consiste em 15 min de eluição empregando uma fase móvel composta por 80:20 acetonitrila:água (v/v).

A condição final de 80:20 (v/v) de acetonitrila:água foi determinada devido ao fato de que porcentagens superiores de acetonitrila impediram a aquisição de espectros, uma vez que quanto maior o teor de solvente orgânico, menor a voltagem aplicada ao capilar necessária para que seja formado o *spray*, e voltagens muito altas podem resultar na deformação do *spray* e, conseqüentemente, impedir a aquisição de um espectro (CASSIANO, 2015; RIEUX, 2006).

Dentre os métodos avaliados foi selecionado o método isocrático, pois este forneceu os menores tempos de retenção, como pode ser observado na FIGURA 13, onde são apresentados os cromatogramas de íon extraído para o método gradiente de condição inicial 30:70 acetonitrila:água (v/v) e o método isocrático de fase móvel de composição 80:20 acetonitrila:água (v/v).

Para o método isocrático foi obtido um perfil de separação adequado, como representado na FIGURA 14. A partir deste perfil foi possível calcular os parâmetros de separação cromatográfica, como apresentados na TABELA 15. Assim, a composição de 80:20 (v/v) de acetonitrila:água foi mantida por 12,5 min, tempo suficiente para que todos os analitos fossem eluídos.

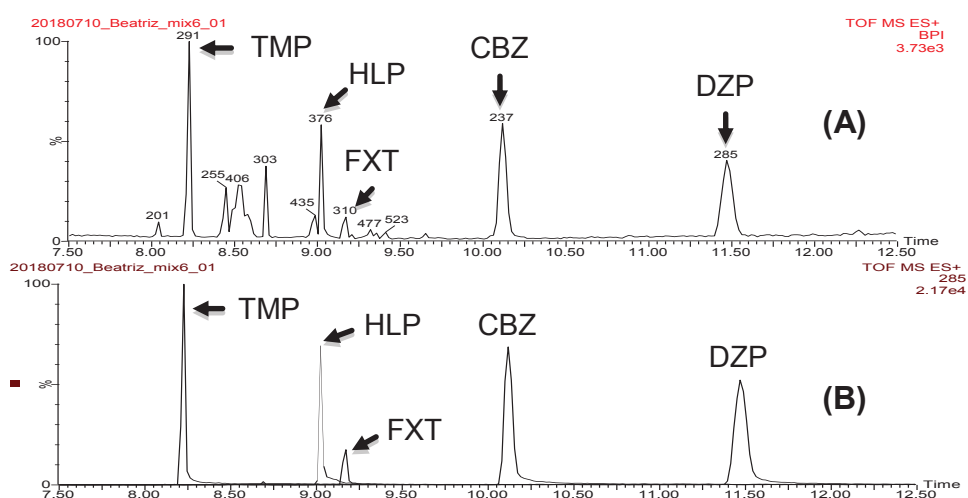
FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDOS A PARTIR DOS MÉTODOS (A) GRADIENTE GRADIENTE 30:70 (v/v) – 80:20 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA E (B) ISOCRÁTICO 80:20 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA



TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2018).

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA (A) FULLSCAN E (B) DE ÍON EXTRAÍDO PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO – MODO ToF-MS



TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2018).

TABELA 15 – PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO nanoACQUITY

Analito	Fator de retenção (k)	Eficiência (N)	Fator de separação (α) ^a	Resolução (Rs) ^a
Trimetoprima	0,023	345240	-	-
Haloperidol	0,122	401022	5,290	14,124
Fluoxetina	0,141	245802	1,150	2,260
Carbamazepina	0,258	96903	1,835	9,265
Diazepam	0,426	51072	1,651	8,120

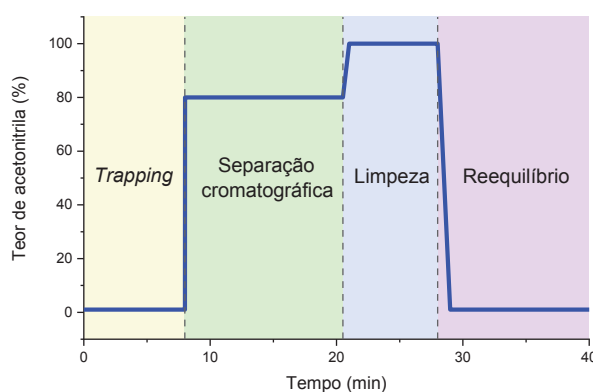
Observação: a – em relação ao pico anterior.

Na FIGURA 14 é possível observar uma série de picos interferentes no modo *fullscan*, entre 7,8 e 9,4 min, onde também podem ser observados os picos cromatográficos de três dos cinco analitos. Estes interferentes são decorrentes principalmente da presença de plastificantes comuns em materiais laboratoriais, tais como oleamida e anidrido ftálico (KELLER et al., 2008). Entretanto, o uso dos cromatogramas de íon extraído permite a eliminação destes picos interferentes ao se isolar a razão massa/carga dos analitos, de forma que essa técnica de deconvolução espectral permite uma análise seletiva mesmo na presença de picos que são eluídos no mesmo tempo de retenção que os analitos.

Após a etapa de separação cromatográfica, foi realizada uma limpeza da coluna para eliminar possíveis compostos residuais do plasma (utilizado na etapa de otimização do método e avaliação dos principais parâmetros de desempenho), que podem se encontrar retidos na fase estacionária. Assim, escolheu-se empregar 100:0 (v/v) acetonitrila:água por 7 minutos, pois este foi o tempo mínimo necessário para minimizar o efeito de memória da coluna.

Por fim, uma etapa de reequilíbrio da nanocoluna cromatográfica é realizada para retornar à condição do *trapping*. Assim, o tempo de 11 min foi selecionado, pois neste período a pressão da coluna já estaria estabilizada novamente, permitindo uma nova análise. O método final está representado no GRÁFICO 1, sendo necessário o tempo total de corrida cromatográfica de 40 min por amostra.

GRÁFICO 1 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO



FONTE: A autora (2018).

4.1.3 Otimização da Técnica HF-LPME

4.1.3.1 Seleção da configuração do sistema

Devido à indisponibilidade de um padrão interno adequado no momento da execução desta avaliação, ou seja, um composto que não seja observado na matriz e que, simultaneamente, fosse passível de extração nos mesmos valores de pH que os analitos e pudesse ser ionizado no modo positivo pela fonte de ionização por eletrospray de forma similar aos analitos, os estudos de otimização da técnica de extração foram conduzidos avaliando-se apenas a área dos picos cromatográficos referentes aos analitos.

Posteriormente, para a avaliação dos principais parâmetros de desempenho do método desenvolvido foi adquirida a fluoxetina-D6, que passou a ser utilizada como padrão interno.

Os primeiros ensaios do estudo com fibra oca foram realizados de acordo com o mais indicado para amostras a serem analisadas por LC, ou seja, escolheu-se trabalhar com um sistema de 3 fases, empregando 20 μL de ácido fórmico pH 2,0 como fase aceptora e 10,0 mL de hidróxido de amônio pH 10,0 como fase doadora, sendo que esta foi fortificada com solução padrão dos analitos a 100 ng mL^{-1} . No entanto, a injeção direta do extrato final deste experimento resultou na obstrução da coluna cromatográfica, decorrente da presença de resíduo de 1-octanol no extrato.

Antes da injeção cromatográfica do extrato, não foi observada separação de fases ou turbidez da amostra, de forma que não haviam evidências macroscópicas de 1-octanol (presente nas paredes da fibra como solvente extrator - MLS) na amostra. Para colunas analíticas com diâmetro interno superior, como as utilizadas para HPLC, o resíduo de 1-octanol presente no extrato obtido por HF-LPME de três fases é desprezível e não resulta no entupimento da coluna, porém, devido ao diâmetro reduzido da coluna analítica de nanoLC (75 μm), o pequeno resíduo do solvente orgânico foi suficiente para entupir a coluna, de forma que a injeção direta de tal extrato se mostrou incompatível com o sistema cromatográfico. Após tentativas de recuperação da coluna pela lavagem com álcool isopropílico o entupimento se provou irreversível e a coluna foi descartada.

Dessa forma, optou-se por secar a fase aceptora coletada da extração. Assim, foram testados três sistemas: duas fases utilizando hexano como fase

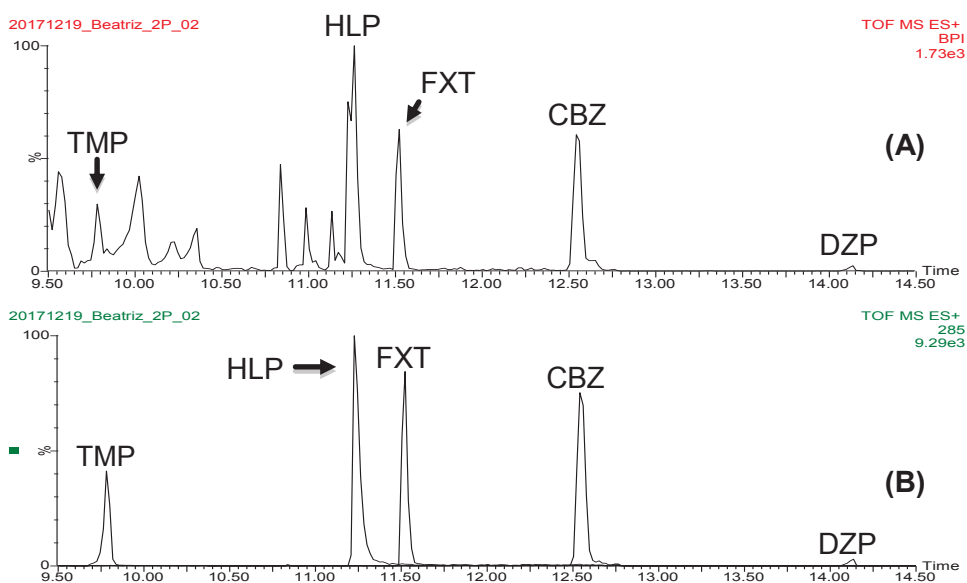
aceptora e MLS, duas fases utilizando 1-octanol como fase aceptora e MLS e três fases utilizando 1-octanol como MLS.

A utilização de hexano seria preferível à de 1-octanol num sistema de 2 fases em que a fase aceptora deve ser evaporada, pois o hexano apresenta uma maior volatilidade e sua evaporação seria mais rápida. No entanto, por este mesmo motivo, ao realizar o teste com o hexano, na coleta da fase aceptora observou-se que todo o solvente havia evaporado nos 30 minutos do procedimento de extração.

Deste modo, comparando os resultados de ambas as extrações com 1-octanol, foi obtido um cromatograma mais satisfatório (maior intensidade dos picos) para o sistema de 2 fases, onde o solvente agiu tanto com MLS como fase aceptora, como pode ser observado nas FIGURAS 15 e 16. A baixa eficiência de extração da CBZ pelo sistema de 3 fases se deve ao fato de que esta se encontra neutra mesmo em pH 2,0, de forma que esta continua a migrar da fase aceptora para a MLS e da MLS para a fase doadora. Dessa forma, apesar de não ser um pareamento padrão, decidiu-se prosseguir nos estudos utilizando a HF-LPME de duas fases em configuração de U.

A partir da seleção do sistema de duas fases e do 1-octanol como fase aceptora e MLS, foi iniciada a otimização univariada dos parâmetros de extração.

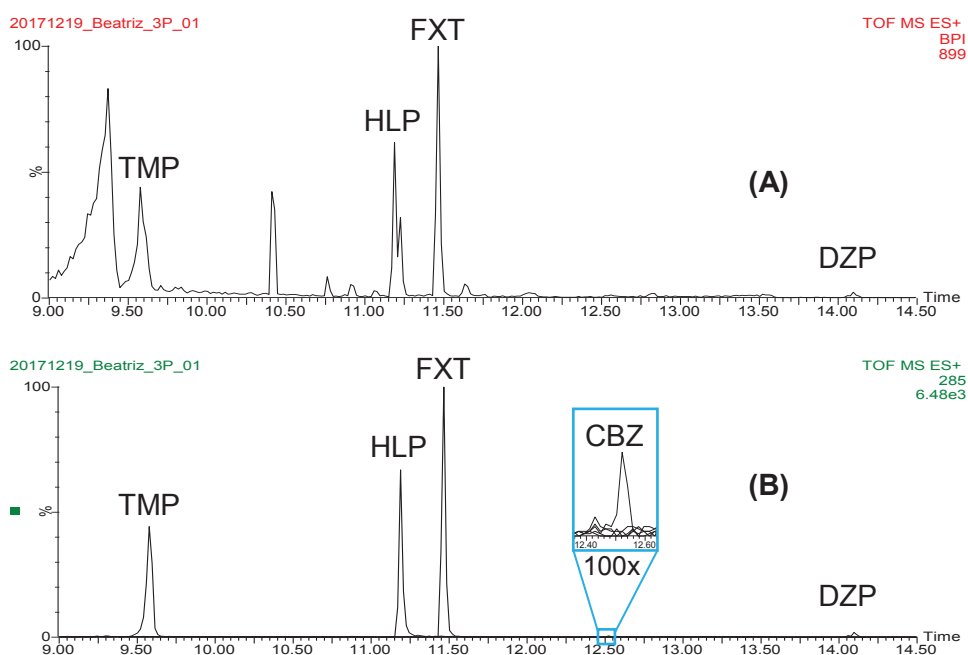
FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA HF-LPME DE 2 FASES COM 1-OCTANOL EM nanoLC-MS, ONDE (A) FULLSCAN E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO



TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2017).

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA HF-LPME DE 3 FASES COM 1-OCTANOL EM nanoLC-MS, ONDE (A) FULLSCAN E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO



TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2017).

4.1.3.2 pH da fase doadora

Para a etapa de otimização dos parâmetros de extração, passou-se a empregar o *pool* de plasma humano branco como amostra, o que permitiu a otimização da extração empregando a própria matriz que é o foco deste trabalho. Nos ensaios apresentados a seguir, realizados visando a otimização dos parâmetros de extração, o padrão interno selecionado, fluoxetina-D6, ainda estava indisponível. Dessa forma, para realizar tais estudos, 250 μ L de plasma foram enriquecidos apenas com os padrões dos cinco analitos nas concentrações apresentadas na TABELA 9.

A faixa de pH da fase doadora foi selecionada de acordo com a faixa de pH em que os analitos se encontram na forma neutra, visando uma maior eficiência de extração favorecida pela maior solubilidade em solventes orgânicos quando nesta forma. Com base nos valores de dissociação ácida de cada espécie, é possível prever qual será a espécie encontrada de forma majoritária para cada analito de acordo com o pH do meio. Estes dados são apresentados na TABELA 16.

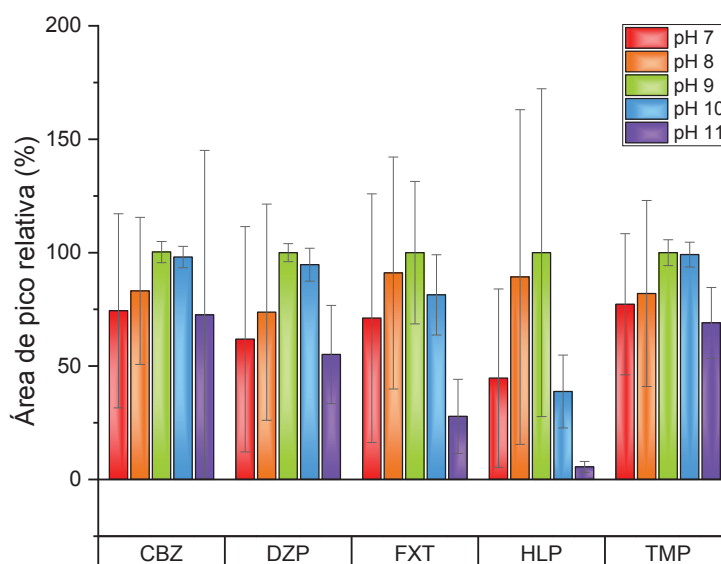
TABELA 16 – FORMA MAJORITÁRIA DOS ANALITOS ENCONTRADA EM DIFERENTES VALORES DE pH

pH	Espécie majoritária do analito				
	CBZ	DZP	FXT	HLP	TMP
7	Neutra	Neutra	Ácido conjugado	Ácido conjugado	Ácido conjugado
8	Neutra	Neutra	Ácido conjugado	Ácido conjugado	Neutra
9	Neutra	Neutra	Ácido conjugado	Neutra	Neutra
10	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra
11	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra

CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

Dessa forma, utilizando hidróxido de amônio para controlar o pH da fase doadora, foram avaliadas cinco condições: pH 7, 8, 9, 10 e 11. O GRÁFICO 2 representa os resultados obtidos, sendo que, devido à uma grande diferença nas concentrações empregadas para cada analito, os gráficos da otimização foram plotados a partir de uma normalização das áreas para cada analito, onde a condição que forneceu a maior área média dos picos cromatográficos foi considerada 100%, e as demais foram consideradas porcentagens relativas a esta área máxima.

GRÁFICO 2 – EFEITO DO pH DA FASE DOADORA (n = 3) EM pH 7, 8, 9 10 E 11 PARA OS ANALITOS, ONDE AS DEMAIS CONDIÇÕES FORAM FIXADAS EM AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 8 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

Aplicando-se análise de variância (“*Analysis of Variance*” - ANOVA), com 95% de confiança, é possível constatar que não há diferença significativa entre as condições de pH da fase doadora avaliadas.

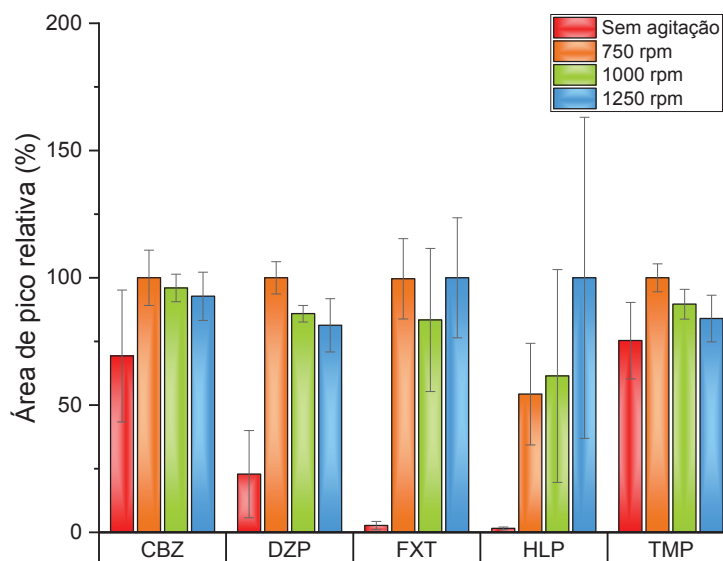
Avaliando-se as condições de pH 9 e 10 para a maioria dos analitos, que corresponde a faixa de pH em que todos os analitos se encontram majoritariamente na forma neutra, o pH 10 forneceu os menores valores de desvio padrão relativo (“*Relative Standard Deviation*” - RSD) para os analitos, exceto para a FXT, cujo menor valor de RSD foi obtido para o pH 9. Nesse aspecto, destaca-se o HLP, para o qual o valor de RSD em pH 9 foi aproximadamente o dobro do obtido para o pH 10, o que impossibilitou trabalhar com o pH 9, visando uma repetibilidade adequada. Dessa forma, o pH 10 foi selecionado como condição de compromisso para o pH da fase doadora.

4.1.3.3 Velocidade de agitação

A agitação da solução doadora é um aspecto importante ao se empregar HF-LPME para que o tempo de equilíbrio seja atingido mais rapidamente, uma vez que a agitação favorece a transferência de massa (MOHAMED et al., 2017; SHARIFI et al., 2015). Assim, foram avaliadas quatro condições selecionadas conforme a faixa de velocidade de agitação permitida pelo agitador magnético disponível: sem agitação, agitação lenta – 750 rpm, agitação intermediária – 1000 rpm, e agitação rápida – 1250 rpm. Os resultados obtidos são apresentados no GRÁFICO 3.

Para os analitos de maior concentração (ver TABELA 9), CBZ e TMP, mesmo com a ausência de agitação foram obtidas eficiências de extração satisfatórias, correspondendo a 70% em relação a melhor condição observada. Para os outros analitos, a menor transferência de massa ocasionada pela ausência de agitação acarretou em baixas eficiências de extração, em especial para FXT e HLP. No entanto, ao se realizar a extração com agitação de 750 rpm, foi constatado um aumento da eficiência de extração para todos os analitos, ao mesmo tempo que menores desvios foram observados nesta condição.

GRÁFICO 3 – EFEITO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (n = 3) EM 0, 750, 1000 E 1250 rpm PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 8 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

Apesar desta observação, com base na aplicação de ANOVA com 95% de confiança, foi possível constatar que apenas para a FXT e o DZP há uma diferença significativa entre os resultados obtidos para as diferentes velocidades de agitação avaliadas. Aplicando-se o teste de Tukey, verificou-se que a extração realizada sem agitação resulta em eficiências de extração significativamente menores. Para os demais analitos não há uma diferença significativa para estes conjuntos de dados.

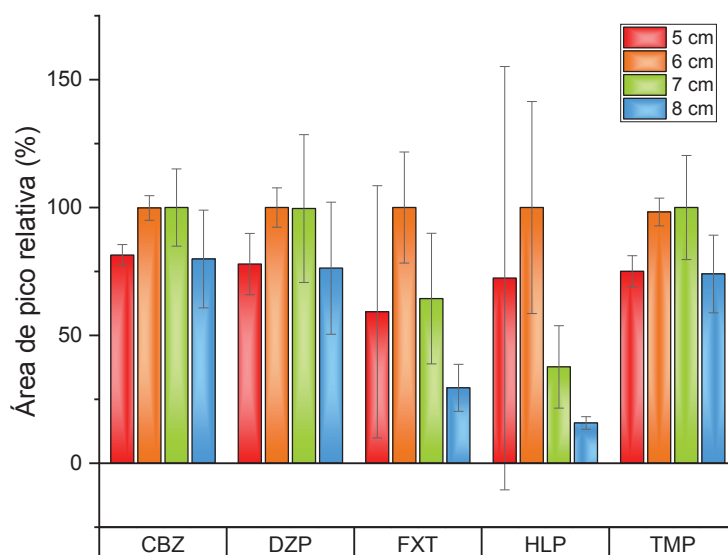
Mesmo não sendo observada uma diferença significativa entre as diferentes velocidades de agitação para a maioria dos analitos, em velocidades superiores a 750 rpm, para FXT, HLP e TMP houve um aumento nos valores de RSD. Esta menor repetibilidade ocasionada pela maior velocidade de agitação pode ser decorrente de uma movimentação menos controlada da barra magnética ou de perda parcial do solvente orgânico imobilizado na fibra (SHARIFI et al., 2015; XIAO et al., 2007). Assim, foi selecionado como condição de compromisso, para dar continuidade à etapa de otimização, a velocidade de agitação de 750 rpm.

4.1.3.4 Tamanho da fibra

O tamanho da fibra oca é limitado tanto pelo tamanho do frasco que contém a amostra, uma vez o “U” formado pela fibra não pode entrar em contato com a barra de agitação, quanto pelo volume de fase aceitadora inserido no interior da fibra, sendo que neste trabalho escolheu-se trabalhar com 20 μL de 1-octanol. Este volume foi escolhido devido à sua baixa pressão de vapor, de 0,14 mmHg a 21 °C (SMALLWOOD, 1996). Esta propriedade resulta num elevado tempo necessário para secagem completa anterior à injeção cromatográfica quanto maior for o volume do extrato.

Como a fibra oca possui um lúmen de 600 μm de diâmetro, o comprimento de uma fibra com 20 μL de volume interno equivale a 7 cm. Dessa forma, foram avaliados comprimentos de fibra comportados pelo *vial* de 10,0 mL que seria utilizado como recipiente da fase aceitadora: 5, 6, 7 e 8 cm. Os resultados estão representados no GRÁFICO 4.

GRÁFICO 4 – EFEITO DO TAMANHO DA FIBRA (n = 3) NOS COMPRIMENTOS DE 5, 6, 7 E 8 cm PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

Aplicando-se ANOVA com 95% de confiança, é possível constatar que não há diferença significativa entre os diferentes comprimentos da fibra oca avaliados.

Entretanto, para a CBZ, DZP e TMP, comparando os comprimentos de 5, 6 e 7 cm, observa-se que os comprimentos de 7 cm forneceu valores de RSD mais elevados para todos os analitos, e para o comprimento de 5 cm foram observados altos valores de RSD para FXT e HLP. Já para comprimentos superiores, a fase aceptora não preenche totalmente o lúmen da fibra, o que resulta na presença de bolhas de ar no seu interior e, com a agitação magnética, formam-se bolhas de ar na superfície da fibra, que por sua vez podem dificultar a migração dos analitos da fase doadora para a MLS devido à menor área de contato entre os dois líquidos, assim como favorece a evaporação do solvente orgânico (DESOU BRIES et al., 2012).

Quando empregado um comprimento de fibra de 6 cm, foi observado um pequeno extravasamento do solvente no momento de inserção da fase aceptora no lúmen da fibra, devido ao volume interno inferior ao volume de 1-octanol utilizado. No entanto, dentre as condições avaliadas, o uso da fibra de 6 cm resultou nos menores valores de RSD para a maioria dos analitos, sendo esta condição selecionada como ótima para o comprimento da fibra.

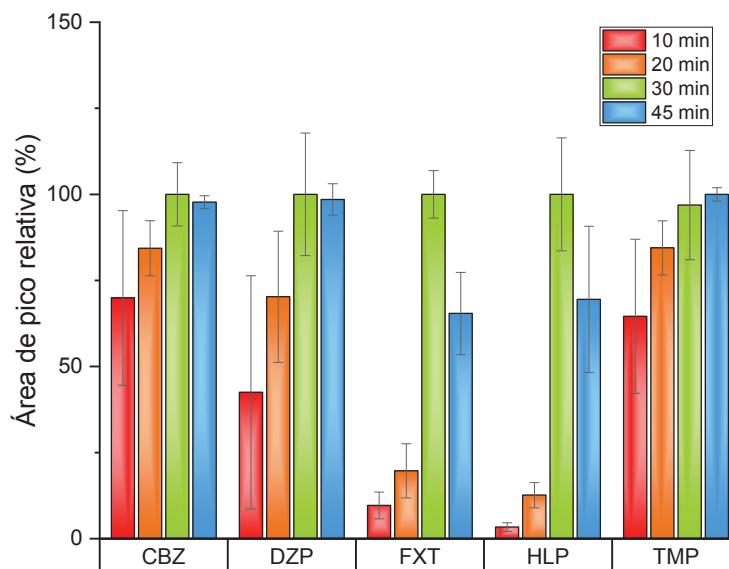
4.1.3.5 Tempo de extração

O tempo de extração é uma variável cuja otimização é crucial para garantir uma alta eficiência de extração quando se empregam técnicas baseadas na partição de um composto entre duas fases. Para a HF-LPME, a duração de uma extração tem sido realizada em até 60 min, sendo que extrações mais longas podem resultar na perda do solvente orgânico (MOHAMED et al., 2017). Adicionalmente, quando são utilizados volumes pequenos de amostra o equilíbrio tende a ser atingido em torno de 15 a 45 min (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). Assim, foram avaliadas quatro condições de tempo de extração: 10, 20, 30 e 45 min. O GRÁFICO 5 apresenta os resultados obtidos.

Ao se avaliar os dados obtidos por ANOVA, com 95% de confiança, foi constatada uma diferença significativa para os analitos HLP, FXT e DZP em relação aos tempos empregados nas extrações. Ao se aplicar o teste de Tukey para verificar os grupos discrepantes, observou-se que para o HLP, os tempos de 30 e 45 min fornecem melhores eficiências de extração, enquanto para FXT e DZP, apenas o

tempo de 10 min de extração resultou numa performance inferior. Para a TMP e a CBZ não foi observada diferença significativa entre os tempos de extração.

GRÁFICO 5 – EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO (n = 3) EM 10, 20, 30 E 45 min PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 6 cm, SEM ADIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E METANOL



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

Em relação à precisão, o tempo de 45 min forneceu o menor valor de RSD para CBZ, DZP e TMP, porém, o tempo de 30 min apresentou valores de RSD inferior a 18% para todos os analitos, dentre estes estão os menores valores obtidos para a FXT e HLP. Adicionalmente, uma metodologia de extração com duração de 30 min fornece uma maior frequência analítica, quando comparada ao tempo de 45 min. Dessa forma, foi selecionado como condição de compromisso o tempo de extração de 30 min.

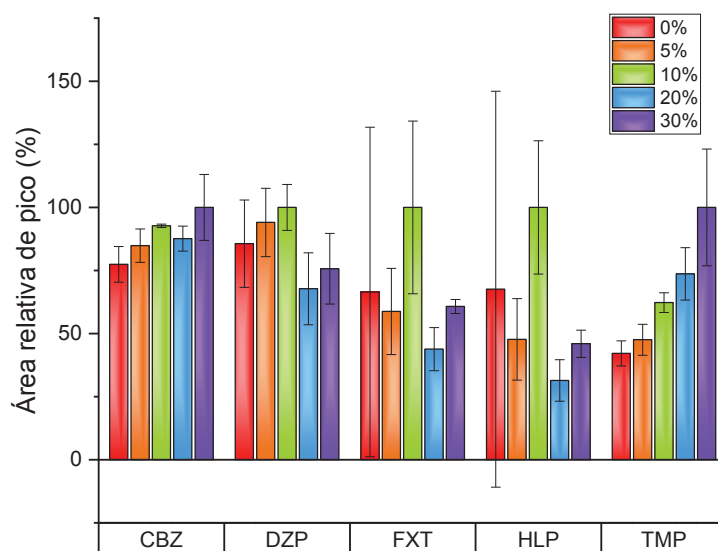
4.1.3.6 Teor de cloreto de sódio

A adição de sal a amostras aquosas, como o plasma humano, é feita para se avaliar o efeito de *salting out* dos analitos, no qual a alteração na força iônica resulta modificação no coeficiente de partição entre a fase doadora e o solvente orgânico, aumentando a eficiência de extração.

Apesar de o mecanismo que resulta no efeito de salting-out, este possivelmente se baseia na combinação de diferentes fatores: uma alta repulsão eletrônica, devido à presença de ânions de alta densidade de carga, e a penalidade entrópica, decorrente de uma proporcionalidade direta entre o teor de sal e a organização da interface analito-água, favorecendo então a formação de agregados do analito. Para realizar o salting-out de uma analito, usualmente são usados sais como fosfatos, sulfatos e cloretos, sendo um dos sais mais utilizados com este intuito o cloreto de sódio (HYDE et al., 2017).

Apesar da incompatibilidade deste sal com LC-MS com ionização por eletrospray, como neste trabalho foi empregada a HF-LPME de duas fases, onde a fase aceptora é o 1-octanol, decidiu-se realizar o estudo de força iônica com cloreto de sódio, pois a sua solubilidade no solvente orgânico é muito baixa, de forma que, mesmo com baixa volatilidade, sua presença em pequenas quantidades não deveria afetar a análise. Assim, foram avaliados cinco concentrações de NaCl, limitadas por sua solubilidade em meio aquoso: 0, 5, 10, 20 e 30 % (m/v). Os resultados obtidos estão representados no GRÁFICO 6.

GRÁFICO 6 – EFEITO DE ADIÇÃO DE SAL (n=3) À FASE DOADORA NAS CONCENTRAÇÕES DE 0, 5, 10, 20 E 30% (m/v) PARA OS ANALITOS, COM DEMAIS CONDIÇÕES FIXADAS EM pH 10 DA FASE DOADORA, AGITAÇÃO DE 750 rpm, COMPRIMENTO DA FIBRA DE 6 cm, TEMPO DE EXTRAÇÃO DE 30 min, SEM ADIÇÃO DE METANOL



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

Com base na ANOVA, com 95% de confiança, foi observado que para a TMP e a CBZ há uma diferença significativa entre os teores de cloreto de sódio utilizados na extração. Através da aplicação do teste de Tukey, constatou-se que para a TPM o teor de 30% de NaCl resulta numa eficiência de extração significativamente maior quando comparado aos teores de 0, 5 e 10%, enquanto para a CBZ, apenas o teor de 0% de NaCl resulta numa eficiência de extração significativamente inferior quando comparada ao teor de 30 %.

Para a TMP, o melhor desempenho da extração para o maior teor de NaCl está possivelmente relacionado a sua maior solubilidade em água, de 0,615 mg mL⁻¹ (DrugBank). Assim, uma vez que para analitos de maior polaridade o efeito salting-out é exibido com uma proporcionalidade mais expressiva, sendo tal resultado é coerente com o apresentado na literatura para outros compostos orgânicos de polaridade mais elevada (FERREIRA et al., 2014).

Apesar da maior eficiência de extração em 30% (m/V) de NaCl para a TMP, para a CBZ tal condição fornece o maior RSD dentre as avaliadas. Este efeito pode ser decorrente da competição entre dois fatores: o aumento da força iônica e alterações das propriedades físico-químicas na superfície da fibra. O último pode afetar a difusão dos analitos através da MLS, prejudicando a reprodutibilidade de extração. Além disso, ao se empregar altas concentrações de sal e manter a amostra sob agitação durante a extração pode resultar na perda da fase aceptora do lúmen da fibra, que por sua vez provocaria uma diminuição na eficiência de extração (LETSEKA; GEORGE, 2016; SHARIFI et al., 2015).

Assim, a concentração de 10% de NaCl (m/v) foi escolhida como condição ótima para a extração dos analitos, pois esta fornece os menores valores de RSD para três dos cinco analitos. Adicionalmente, não foram observadas consequências críticas para a análise devido ao uso de teores elevados de cloreto de sódio no preparo de amostra, como, por exemplo, precipitação do sal na coluna analítica e elevação da pressão no sistema cromatográfico.

4.1.3.7 Teor de metanol

Devido à ligação de fármacos com proteínas plasmáticas, a recuperação dos mesmos pode ser afetada na etapa de preparo de amostra, pois uma das principais características da HF-LPME é sua alta eficiência de *clean-up* e, conseqüentemente,

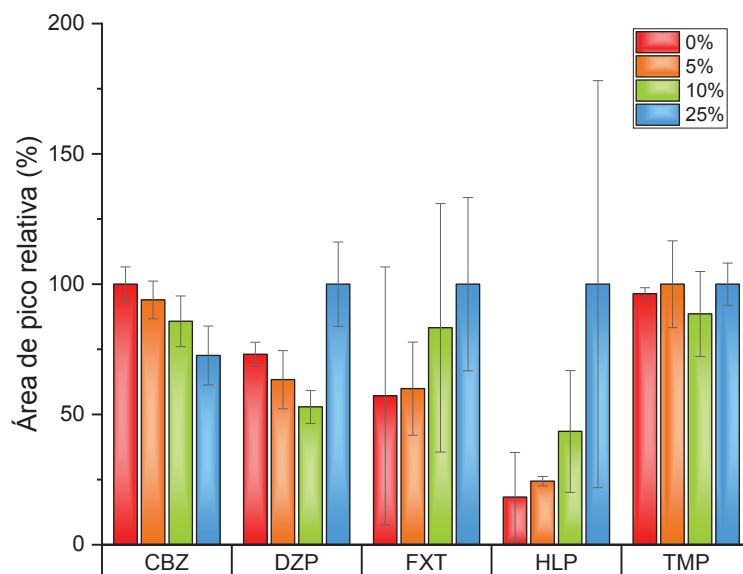
os fármacos ligados às proteínas permanecerão na fase doadora. Para reduzir a perda dos analitos durante esta etapa é possível realizar a adição de metanol ou outros solventes orgânicos miscíveis em água à amostra, a qual diminui as interações proteína-fármaco, tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, e permite uma maior recuperação dos analitos (HO et al., 2002b).

Dois fatores estão envolvidos na ruptura desta ligação após a adição do solvente hidrofílico, um deles sendo a redução na constante dielétrica da amostra e, conseqüentemente, uma atração entre as moléculas de proteína, e o outro a competição da ligação com água entre o solvente hidrofílico e a proteína, que por sua vez modifica a camada de solvatação e a conformação da proteína, ambos mecanismos resultando na liberação do fármaco (LI et al., 2015). No caso de fármacos com alto teor de ligação com proteínas, a eficiência de extração pode ser elevada pela adição de um solvente orgânico hidrofílico até a proporção de 1:1 (v/v) (HO et al., 2002b).

Assim, foram avaliadas cinco concentrações de metanol: 0, 5, 10, 25 e 50% (v/v). No entanto, ao se adicionar 50% de metanol à amostra, durante o procedimento de extração observou-se turbidez na amostra, e após a secagem do extrato, observou-se a formação de cristais brancos no interior do *vial* que foram ressolubilizados ao se adicionar água com ácido fórmico 0,10% (v/v). Isto indica que o alto teor de metanol resultou numa maior miscibilidade entre água e 1-octanol e, conseqüentemente, a fase aceptora passa a conter NaCl. Devido à incompatibilidade de NaCl com fonte de ionização e o risco de que o mesmo seja precipitado na nanocoluna, decidiu-se descartar esta condição. O GRÁFICO 7 representa as demais condições avaliadas.

Com base na aplicação da ANOVA, como 95% de confiança, foi observada diferenças significativas entre os teores de metanol avaliados para a CBZ e o DZP. Aplicando-se o teste de Tukey, para a CBZ as condições de 0 e 25% de metanol são diferentes significativamente entre si, sendo a condição de 25% de metanol a que fornece menor eficiência de extração, enquanto para o diazepam, a condição de 25% de metanol resulta em uma extração mais eficiente quando comparado aos teores de 10 e 5% de metanol. Para os demais analitos, não há uma diferença significativa entre os teores de metanol avaliados.

GRÁFICO 7 – EFEITO DE ADIÇÃO DE METANOL (n=3) À FASE DOADORA NAS CONCENTRAÇÕES DE 0, 5, 10 E 25% PARA OS ANALITOS



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2018).

A menor eficiência de extração para CBZ empregando 25% (v/v) de metanol, um dos analitos que apresenta interação com proteínas relativamente baixa, pode ser decorrente da diminuição da polaridade da fase doadora e, conseqüentemente, uma diminuição no coeficiente de partição entre a fase doadora aquosa e a fase orgânica, utilizada tanto como MLS e fase aceptora. Ho et al. (2002b) reportou uma queda na recuperação para cinco fármacos após a sua extração de amostras de plasma por HF-LPME quando empregado um alto teor de metanol, condizente com os resultados encontrados neste trabalho.

Além de fornecer uma resposta significativamente inferior para a extração de CBZ, a condição de 25% (v/v) de metanol resultou em valores de RSD superiores a 30% para FXT e HLP, atingindo 78% para o último. No estudo de Porto et al. (2012), este mesmo efeito foi observado para a fluoxetina, citalopram e paroxetina após a adição de metanol em amostras de plasma.

A adição de 5% de metanol (v/v) resultou nos menores valores de RSD para dois dos cinco analitos, e para os demais este valor foi inferior a 18%. Sendo assim, está condição foi selecionada.

Na TABELA 17 estão representados os parâmetros de compromisso para o procedimento de extração, que serão adotados na avaliação dos principais

parâmetros de desempenho do método desenvolvido. A partir desta etapa será feito uso de um padrão interno, a fluoxetina-D6, que atuará de forma a corrigir variações tanto da extração quanto da técnica de análise, potencialmente reduzindo os valores de RSD.

TABELA 17 – PARÂMETROS DE COMPROMISSO DA TÉCNICA DE HF-LPME

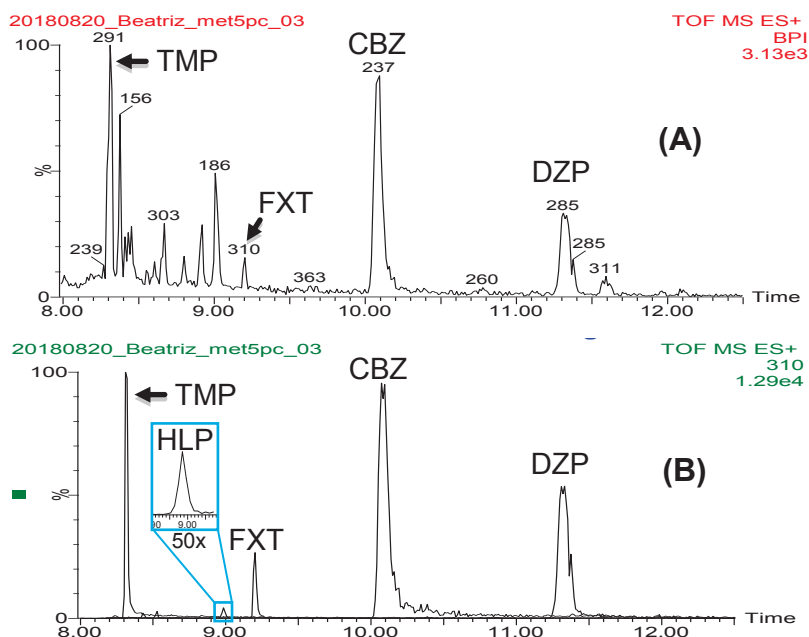
Parâmetros	Valor escolhido
pH da fase doadora	10
Agitação	750 rpm
Tamanho da fibra	6 cm
Tempo de extração	30 min
Teor de sal	10 % (m/v)
Teor de metanol	5 % (v/v)

Vale se destacar que durante a condução dos experimentos com a HF-LPME fazendo uso de alíquotas de plasma humano, foi observado que em até 4 meses as nanocolunas analíticas não apresentaram quedas na performance e ou problemas de entupimento devido ao teor proteico da amostra, sendo que tempos superiores não foram avaliados. O tempo de vida útil para uma coluna preparada de acordo com o mesmo procedimento descrito neste trabalho (seção 3.3) é entorno de 1 a 1,5 meses para as análises de rotina da Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas, contituídas majoritariamente por análises de extratos peptídicos de diversas matrizes.

Este fator reflete um indício de uma eficiência de *clean-up* satisfatória, uma vez que tais componentes endógenos da matriz são responsáveis por entupimentos das colunas cromatográficas devido a possibilidade de adsorção irreversível em fases estacionárias como a sílica-C18 (MULLETT, 2007).

Outro indício de uma eficiência de *clean-up* satisfatória é o fato de que cromatogramas referentes a análise de extratos do plasma humano obtidos com as condições de extração de compromisso permitem uma vizualização clara dos picos cromatográficos de quatro analitos, mesmo no modo de aquisição *fullscan* como pode ser observado na FIGURA 17. O único pico não visível no modo *fullscan* é o do haloperidol, porém isso se deve a baixa concentração do mesmo, 20 ng mL⁻¹, nas amostras empregadas nos experimentos desta etapa. Porém, no cromatograma de íon extraído o pico passa a ser observado com uma razão sinal/ruído adequada.

FIGURA 17 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA HF-LPME EMPREGANDO AS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO, ONDE (A) FULLSCAN E (B) CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO



TMP – trimetoprima; HLP – haloperidol; FXT – fluoxetina; CBZ – carbamazepina; DZP - diazepam

FONTE: A autora (2017).

4.2 TRANSPOSIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA SISTEMA ANALÍTICO DISTINTO

Até esta etapa do estudo foram concluídas a otimização do processo de ionização, método cromatográfico e da técnica de HF-LPME, como descrito anteriormente. No entanto, para continuar com este estudo e definir parâmetros de desempenho preliminares do método analítico desenvolvido, foi necessária uma série de alterações que, por sua vez, exigiram novas etapas de otimização do método.

Dentre estas alterações pode-se citar a mudança das partículas de C18 empregadas na confecção das colunas analíticas, devido a dificuldades durante o empacotamento das colunas com partículas de 2,4 μm de diâmetro. Assim, passou-se a utilizar colunas com partículas de C18 com diâmetro de 3,0 μm . Outra alteração imprescindível para a continuidade do trabalho foi a alteração do sistema analítico, devido à quebra do autoamostrador do nanoAcquity, cromatógrafo utilizado nas etapas descritas até o momento. Dessa forma, passou-se a utilizar o cromatógrafo

EASY-nLC e, conseqüentemente, o espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap XL.

A seguir serão descritas as otimizações necessária decorrentes de tais modificações.

4.2.1 Estudos de Ionização e Fragmentação dos Analitos

Comparando-se as áreas dos picos cromatográficos observados ao realizar corridas cromatográficas injetando um mix dos padrões a 20 ng mL^{-1} , foi observado um aumento gradual conforme o aumento da voltagem de spray até 3000 V para quatro dos cinco analitos e para o padrão interno, refletindo um aumento na eficiência de ionização para os analitos. Já para a trimetoprima, este aumento foi observado até 3500 V, porém, para os demais compostos observou-se uma queda na resposta de 37,3% a 72,7%, resultante do uso de uma energia excessiva que possivelmente resultou na fragmentação dos analitos na etapa de ionização. Assim, selecionou-se como condição de compromisso a voltagem do spray de 3000 V.

Em relação ao estudo de fragmentação, foram otimizadas energias de colisão normalizadas para aquisição dos dados de espectrometria de massas sequencial tanto para o uso da armadilha de íons linear, que realiza a fragmentação empregando CID, quanto para o uso do Orbitrap, que realiza a fragmentação por HCD. As energias foram otimizadas de forma individual para os analitos, pois se almeja a obtenção de um espectro de MS2 produzido a partir da fragmentação de apenas um íon de razão massa/carga selecionada. As energias de colisão normalizadas otimizadas foram selecionadas de forma a não ser observada uma fragmentação excessiva dos íons a ponto de se eliminar o sinal do íon precursor, uma vez que para a fluoxetina e seu análogo deuterado, e para a carbamazepina foram observados poucos íons, principalmente ao realizar a fragmentação por HCD. Tais valores são apresentados na TABELA 18, juntamente com os íons mais intensos obtidos.

TABELA 18 – ENERGIAS DE COLISÃO NORMALIZADAS OTIMIZADAS E ÍONS OBSERVADOS APÓS A FRAGMENTAÇÃO

Analito	Modo de Fragmentação			
	CID		HCD	
	ECN (%)	Íons mais intensos (m/z)	ECN (%)	Íons mais intensos (m/z)
Carbamazepina	20	194,08 220,08 237,08	30	194,09605 237,10185
Diazepam	25	104,92 154,00 182,00 193,08 222,08 228,08 257,08 285,08	58	154,04175 193,08832 222,11482 228,05741 257,08368 285,07840
Fluoxetina-D6	17	154,00 316,25	15	316,17795
Fluoxetina	15	148,00 310,17	18	310,14035
Haloperidol	18	122,92 165,00 358,17 376,25	32	123,02403 165,07079 358,13589 376,14621
Trimetoprima	24	122,92 181,00 230,17 258,17 261,17 275,17 276,17 291,17	52	123,06651 230,11589 261,09781 275,11340 291,14459

CID – Dissociação induzida por colisão, ECN – Energia de colisão normalizada, HCD – Dissociação induzida por colisão de alta energia

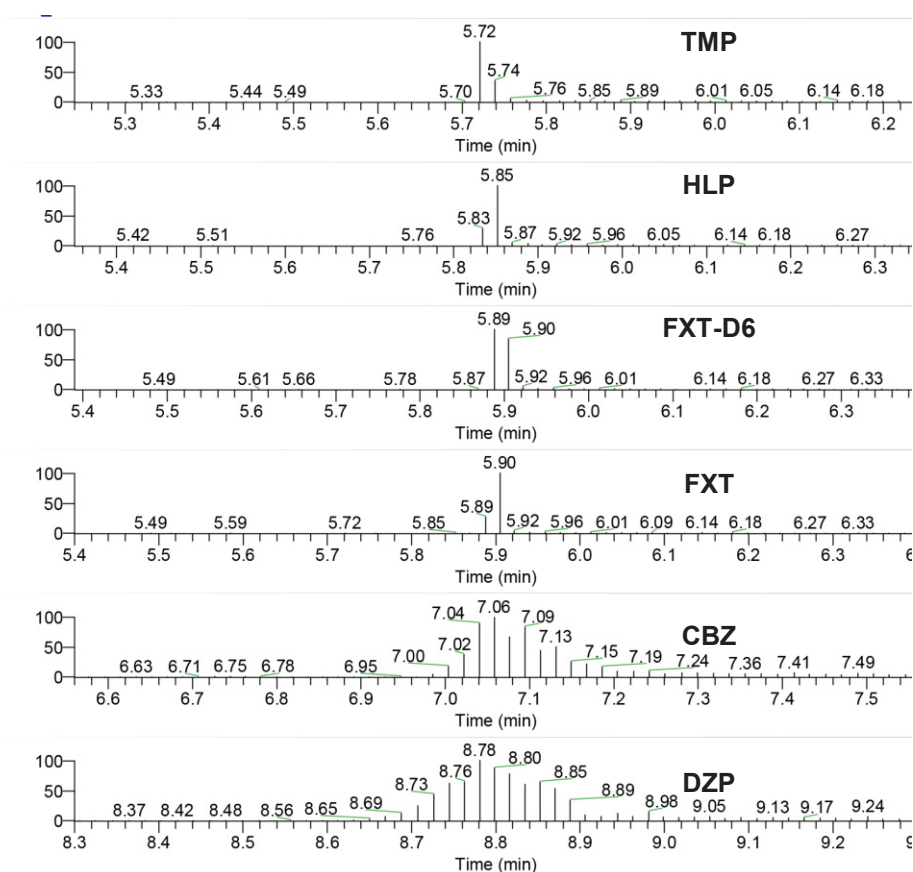
Observação: energia de colisão normalizada se refere a porcentagem de amplitude de radiofrequência empregada na fragmentação dos íons precursores.

4.2.2 Ajuste do Método Cromatográfico

Ao realizar a transposição do método cromatográfico desenvolvido empregando o equipamento nanoAcquity para o Easy-nLC sem alterações e realizando a apenas aquisição *fullscan* dos íons precursores pelo Orbitrap, ou seja, sem fragmentação, foi observada a coeluição de três dos cinco analitos e do padrão interno em um tempo de retenção próximo ao tempo morto da análise, como é possível observar na FIGURA 18. Adicionalmente, para estes compostos pouco retidos foram observados apenas um ou dois pontos de aquisição na varredura dos

íons precursores, ou seja, sem fragmentação, o que impede a construção de um pico cromatográfico adequado, refletindo a necessidade de se alterar alguns parâmetros do método.

FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO DESENVOLVIDO NO nanoACQUITY



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

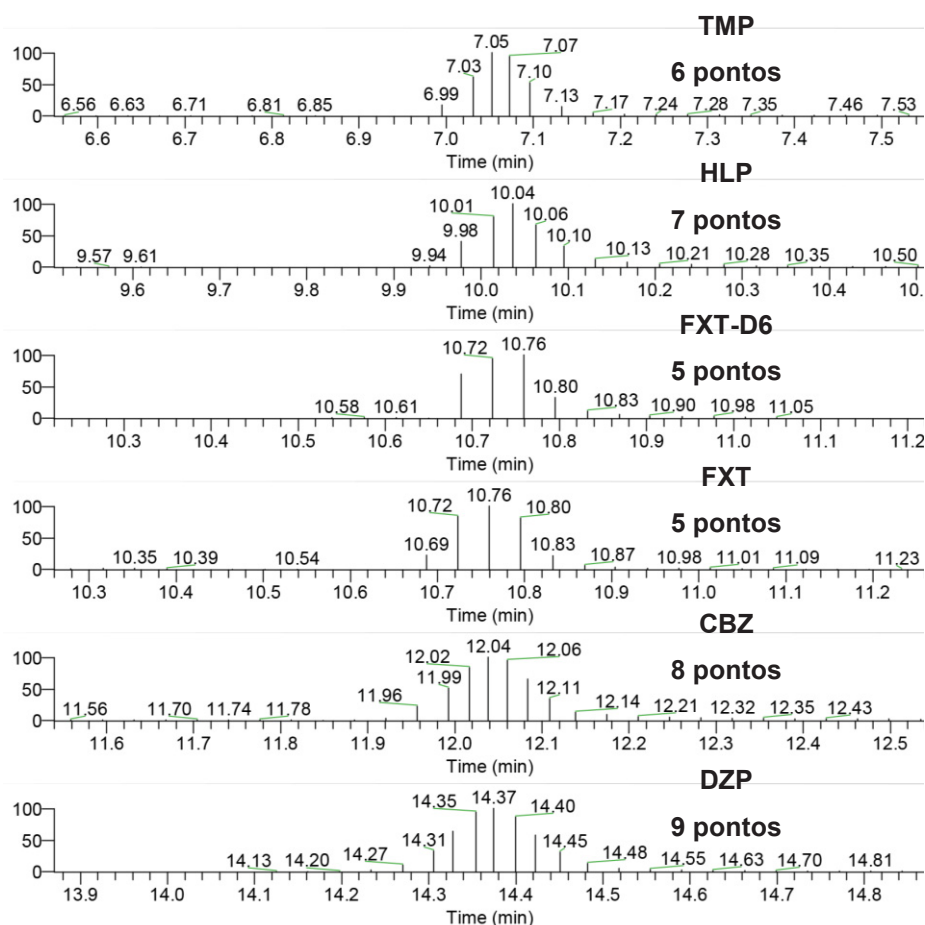
FONTE: A autora (2019).

Para isto, foram modificados os parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas, onde o tempo máximo de acúmulo de íons foi reduzido de 1000 ms para 12,5 ms, a contagem máxima de íons foi reduzida de 1000000 para 50000, e a resolução de massa foi reduzida de 60000 para 30000. Estas alterações foram feitas com o intuito de diminuir o tempo necessário para o Orbitrap completasse uma varredura.

Em relação ao método cromatográfico, foram testados diversos programas de eluição. Inicialmente foram avaliados diferentes métodos isocráticos, porém, mesmo

empregando fases móveis com menor teor de água, como a proporção 50:50 (v/v) de acetonitrila:água, não foi possível aumentar o número de pontos de aquisição para os quatro compostos menos retidos, especialmente para a trimetoprima que exibiu apenas um ponto de aquisição. Dessa forma, foram testados diferentes métodos baseados em gradientes de fase móvel. O método que apresentou o melhor desempenho, permitindo a obtenção de número superior de pontos de aquisição para trimetoprima, haloperidol, fluoxetina e seu análogo deuterado, no mínimo de tempo possível, emprega um gradiente que se inicia com a proporção de 30:70 (v/v) de acetonitrila:água e atinge 100% de água após 15 minutos. O cromatograma de íon extraído resultante destas alterações está representado na FIGURA 19.

FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO CROMATOGRÁFICO BASEADO EM GRADIENTE 30:70 (v/v) – 0:100 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA COM DURAÇÃO DE 15 MINUTOS E AQUISIÇÃO MS1 NO ORBITRAP E MS2 NO ORBITRAP



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2019).

Esta aquisição foi realizada empregando uma etapa de *fullscan* no Orbitrap dois íons precursores (MS1) com resolução de massa de 30000, sem a fragmentação, com o intuito de empregá-la para a quantificação dos analitos, e uma etapa de aquisição *fullscan* no Orbitrap dos íons produto (MS2) com resolução de massa de 15000, realizando a fragmentação por HCD, visando empregá-la para identificação dos analitos. Vale-se destacar que, devido à adição da etapa de aquisição MS2, foi observada uma redução no número de pontos de aquisição MS1 para carbamazepina e diazepam. Adicionalmente, o número de pontos de aquisição não atingiu um número ideal para quantificação de todos os analitos na aquisição MS1, principalmente para a fluoxetina e seu análogo deuterado que, devido à sua coeluição, a aquisição MS1 atingiu o máximo de cinco pontos, uma vez que nesta faixa de tempo o Orbitrap teria que alternar entre três varreduras: *fullscan* dos íons precursores da fluoxetina e fluoxetina-D6, *fullscan* dos íons produtos da fluoxetina e *fullscan* dos íons produtos da fluoxetina-D6.

Dessa forma, com o intuito de diminuir o tempo necessário para a aquisição MS2 e, conseqüentemente, aumentar o número de pontos de aquisição para os analitos na aquisição MS1, decidiu-se empregar a armadilha de íons linear para a análise dos íons produtos formados pela fragmentação por CID. A aquisição foi feita utilizando um tempo máximo de acúmulo dos íons de 10 ms e contagem máxima de íons de 30000. Tal abordagem permitiu a obtenção de um número adequado de aquisições MS1 para todos os analitos, porém, o uso da armadilha de íons linear impossibilitou o uso da massa exata para a identificação dos analitos, de forma que a identificação por MS2 só poderá ser realizada com base no perfil de fragmentação obtido. A TABELA 19 apresenta os parâmetros de separação cromatográficas obtidos para o método de eluição em gradiente otimizado, e o cromatograma de íon extraído obtido para o método cromatográfico e espectrométrico otimizado está representado na FIGURA 20.

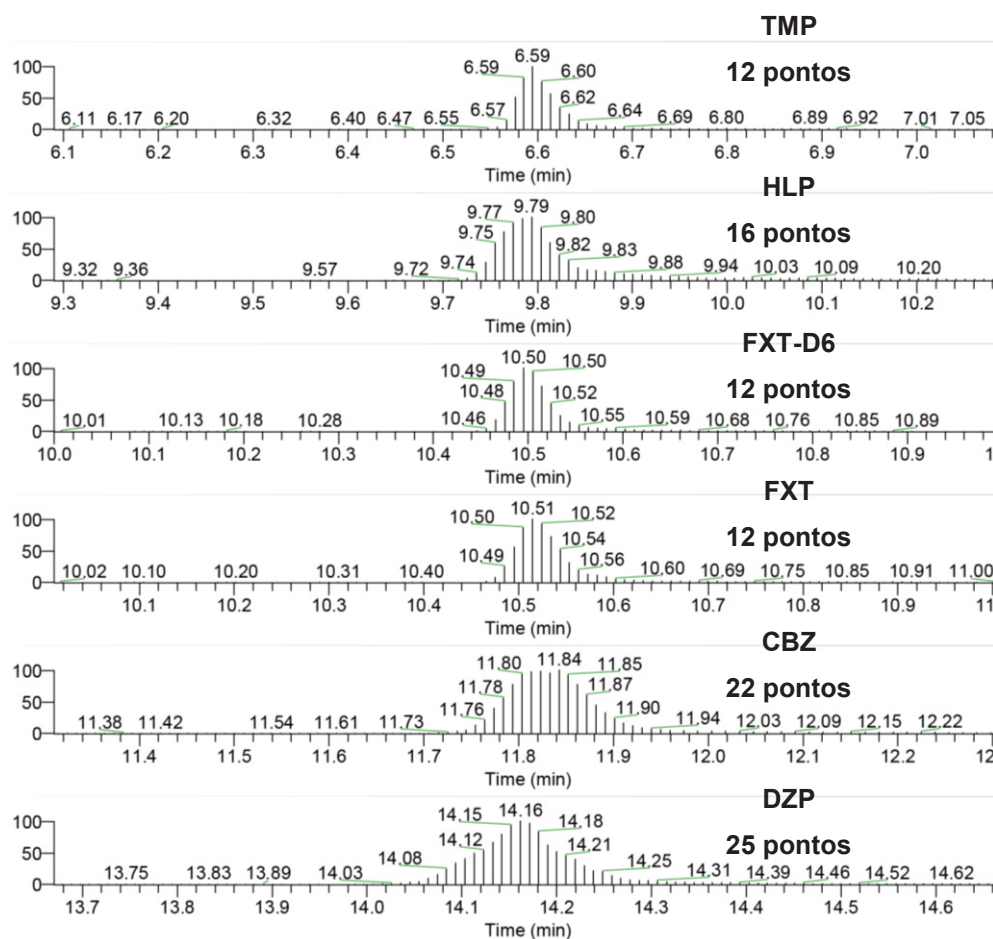
As demais etapas do método cromatográfico foram estabelecidas como uma limpeza de 12 min, correspondendo a uma lavagem da coluna com um volume de 100 % (v/v) de acetonitrila equivalente a 4,5 vezes o volume interno da coluna, reequilíbrio de 9 min, através da percolação de fase móvel com proporção de 1:99 (v/v) acetonitrila:água até que fosse observada a reestabilização da pressão da coluna. O GRÁFICO 8 apresenta o método cromatográfico otimizado aplicado com o EASY-nLC.

TABELA 19 – PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO EASY-nLC

Analito	Fator de retenção (k)	Eficiência (N)	Fator de separação (α) ^a	Resolução (Rs) ^a
Trimetoprima	0,169	70301	-	-
Haloperidol	0,652	123351	3,854	26,488
Fluoxetina	0,764	109410	1,172	5,590
Carbamazepina	0,986	69779	1,290	8,621
Diazepam	1,372	47937	1,392	10,531

Observação: a – em relação ao pico anterior.

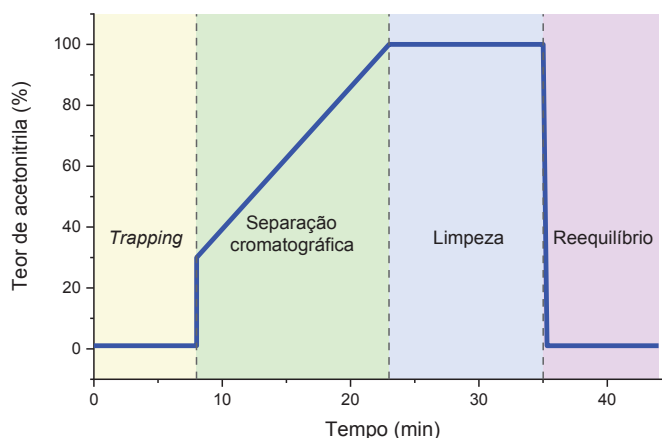
FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO NO EASY-nLC COM O MÉTODO CROMATOGRÁFICO BASEADO EM GRADIENTE 30:70 (v/v) – 0:100 (v/v) ACETONITRILA:ÁGUA COM DURAÇÃO DE 15 MINUTOS E AQUISIÇÃO MS1 NO ORBITRAP E MS2 NA ARMADILHA DE ÍONS LINEAR



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2019).

GRÁFICO 8 – MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO NO EASY-nLC



FONTE: A autora (2019).

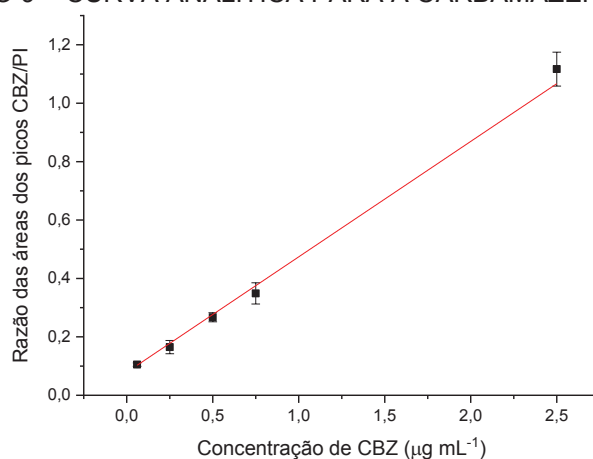
4.3 AVALIAÇÃO INICIAL DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO

4.3.1 Curva analítica

Após a otimização do método de extração, foram preparadas curvas analíticas com pontos obtidos a partir da extração do plasma fortificado com o padrão dos analitos nas concentrações 0,02, 0,06, 0,25, 0,50, 0,75, 1,5 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando as condições de compromisso selecionadas para todos os fármacos selecionados para este estudo. Nesta etapa do estudo fez-se uso de um padrão deuterado, a fluoxetina-D6, como padrão interno, que foi adicionado ao meio na concentração de 0,025 ng mL^{-1} no volume final de 10,0 mL de amostra. As curvas obtidas estão representadas nos GRÁFICOS 9 a 13.

É possível observar que para um dos cinco analitos não foi atingida uma linearidade satisfatória, impossibilitando a utilização do método desenvolvido para diazepam. Para os demais analitos, foram observados valores de coeficiente de correlação superiores a 0,99, indicando linearidade satisfatória de acordo a as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

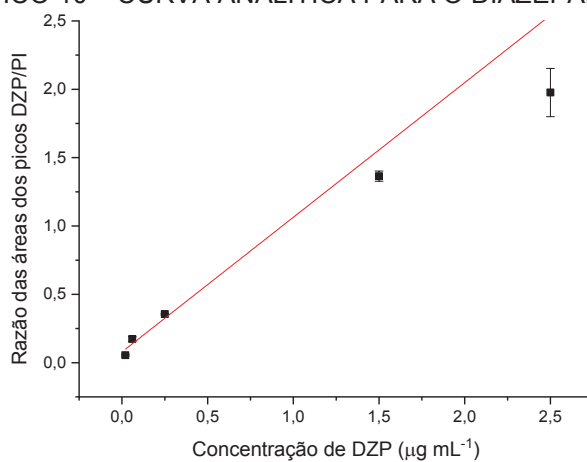
GRÁFICO 9 – CURVA ANALÍTICA PARA A CARBAMAZEPINA (n=3)



CBZ – carbamazepina; PI – padrão interno

FONTE: A autora (2019).

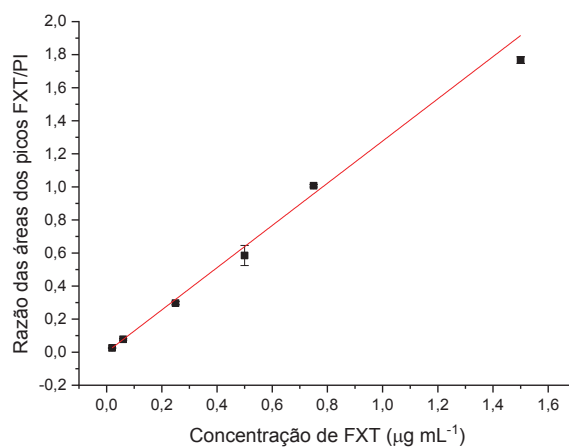
GRÁFICO 10 – CURVA ANALÍTICA PARA O DIAZEPAM (n=3)



DZP - diazepam; PI – padrão interno

FONTE: A autora (2019).

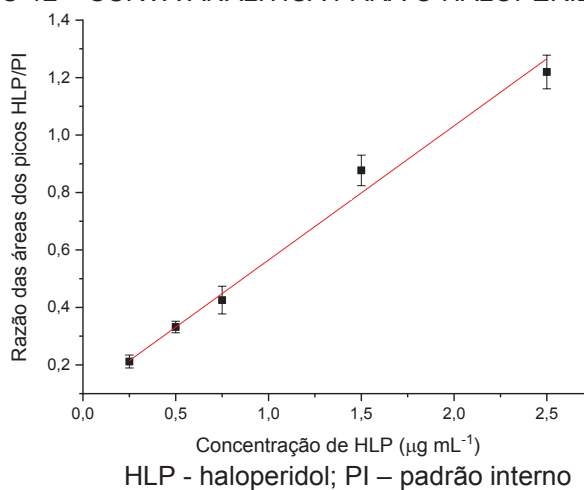
GRÁFICO 11 – CURVA ANALÍTICA PARA A FLUOXETINA (n=3)



FXT - fluoxetina; PI – padrão interno

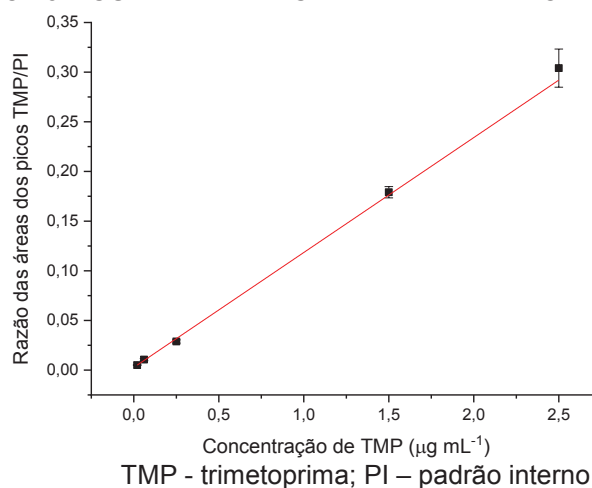
FONTE: A autora (2019).

GRÁFICO 12 – CURVA ANALÍTICA PARA O HALOPERIDOL (n=3)



FONTE: A autora (2019).

GRÁFICO 13 – CURVA ANALÍTICA PARA A TRIMETOPRIMA (n=3)



FONTE: A autora (2019).

Em relação ao limite de quantificação inferior limite inferior de quantificação (“*Lower Limit of Quantification*” – LLOQ), a Food & Drug Administration (FDA), agência responsável pela emissão de normas para validação de métodos bioanalíticos nos Estados Unidos, define este valor como o menor ponto da curva analítica, e a razão entre a resposta do analito no LLOQ e no zero de calibração, ou seja, extrato onde a fortificação foi realizada apenas com o padrão interno, deve ser superior a 5 (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Esta razão se encontrou entre 9,34 e 101 para aqueles que apresentaram um resposta linear na curva analítica. A TABELA 20 apresenta os parâmetros de desempenho faixa dinâmica linear, linearidade e LLOQ para os analitos avaliados.

TABELA 20 – PARÂMETROS DE DESEMPENHO PRELIMINARES

Analito	Faixa dinâmica linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coefficiente de correlação de Pearson (r)	LLOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da Retra
Carbamazepina	0,06 - 2,5	0,99744	0,06	$y = 0,39518x + 0,07888$
Diazepam	-	0,97403	-	-
Fluoxetina	0,02 - 1,5	0,99783	0,02	$y = 1,27716x + 0,00026$
Haloperidol	0,25 - 2,5	0,99571	0,25	$y = 0,46709x + 0,09796$
Trimetoprima	0,02 - 2,5	0,9984	0,02	$y = 0,11571x + 0,00271$

LLOQ – limite inferior de quantificação.

4.3.2 Precisão e exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados de acordo com o desvio padrão relativo obtido para os pontos da curva, e a exatidão foi calculada de acordo com a proximidade destes pontos após sua interpolação nas equações de reta definidas para as curvas. Tais dados são apresentados na TABELA 21.

TABELA 21 – PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO (n=3)

Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)
Carbamazepina	0,06	5,6	110,4
	0,25	13,8	87,0
	0,50	5,8	95,2
	0,75	10,4	91,1
	2,50	5,2	105,1
Fluoxetina	0,02	6,3	97,6
	0,06	6,5	101,3
	0,25	3,3	93,0
	0,50	10,4	91,6
	0,75	0,8	105,1
Haloperidol	1,50	1,2	92,2
	0,25	10,6	97,5
	0,50	6,0	100,2
	0,75	11,3	93,5
	1,50	6,1	111,2
Trimetoprima	2,50	4,8	96,0
	0,02	7,2	101,0
	0,06	10,2	113,7
	0,25	5,7	90,2
	1,50	3,1	101,6
	2,50	6,3	104,2

RSD – desvio padrão relativo

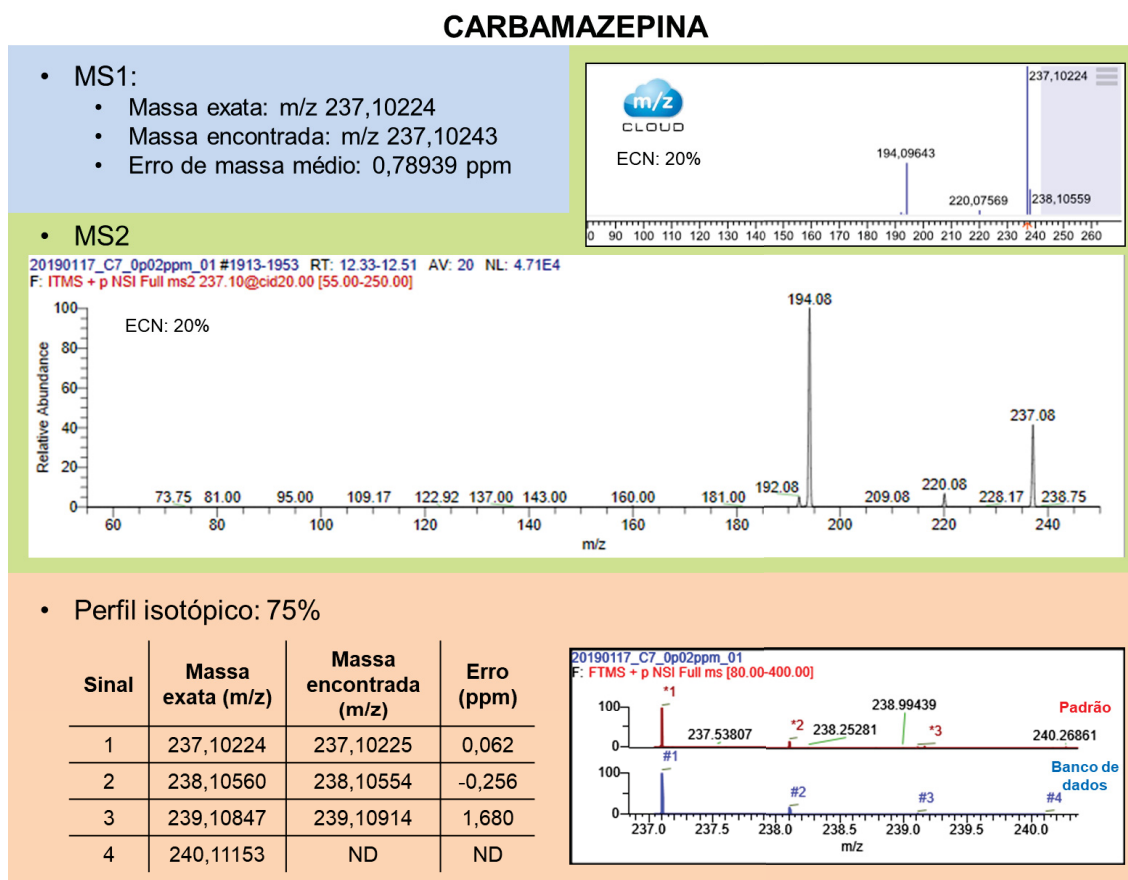
Segundo a FDA, os pontos de uma curva analítica devem apresentar precisão e exatidão dentro de um intervalo de 20% para LLOQ e 15% para os demais pontos da curva (Food and Drug Administration (FDA) (2018)). Dessa forma, é possível

afirmar que precisão e exatidão satisfatórias foram atingidas pelo método analítico desenvolvido para quatro dos cinco analitos avaliados, uma vez que a curva do diazepam não apresentou comportamento linear.

4.3.3 Seletividade e especificidade

Apesar de o LLOQ de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ não ter sido atingido para todos os analitos, a identificação dos analitos nesta concentração foi bem-sucedida empregando a massa exata do íon molecular protonado, o perfil isotópico e o perfil de fragmentação por CID, como pode ser observado na FIGURA 21 e APÊNDICE B, onde os resultados obtidos a partir da extração dos analitos nesta concentração são comparados a informações fornecidas sobre o perfil isotópico e o perfil de fragmentação dos analitos pelos bancos de dados do software TraceFinder 4.1 e do site m/zCloud, respectivamente.

FIGURA 21 – FERRAMENTAS EMPREGADAS NA IDENTIFICAÇÃO DA CARBAMAZEPINA



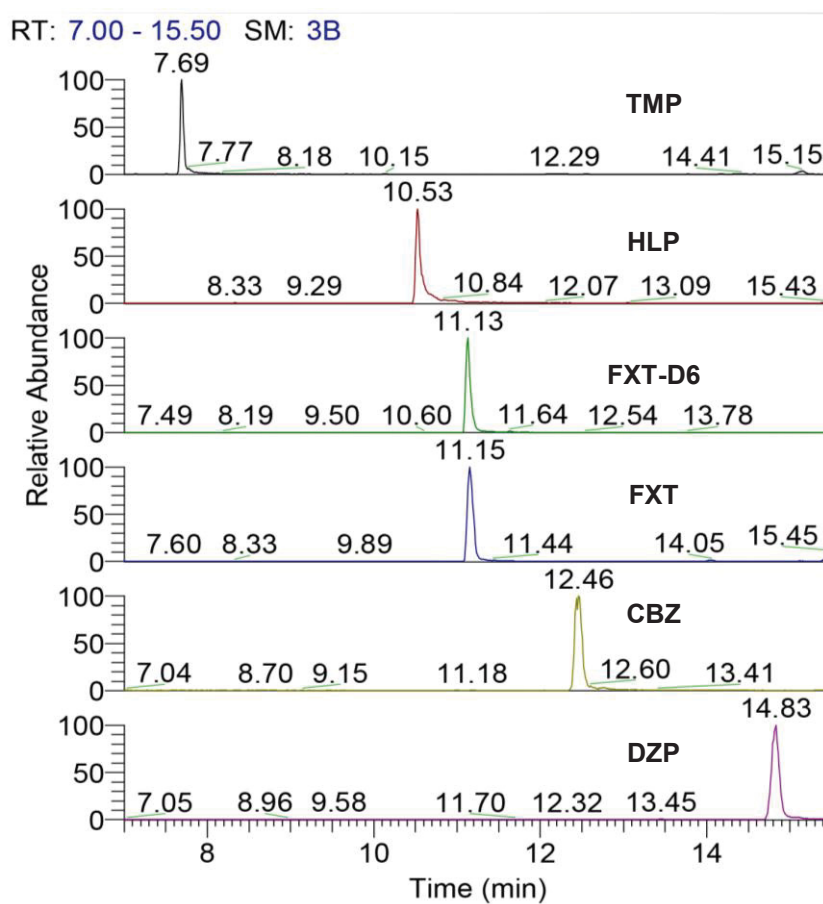
m/z – razão massa/carga; ECN – energia de colisão normalizada; ND: não detectado

FONTE: A autora (2019).

Adicionalmente, a razão entre as respostas para os analitos encontradas na concentração de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e no ponto zero de calibração, que corresponde a extração do plasma humano branco fortificado apenas com o padrão interno, se encontra na faixa de 9,34, para a fluoxetina, a 60,5 para o diazepam, demonstrando a seletividade do método.

Em relação ao estudo de especificidade, a partir da extração dos analitos numa concentração de $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ na presença de diversos possíveis interferentes, como analgésicos, antibióticos, antirretrovirais, hormônios, anti-inflamatórios, inibidores de bomba de próton, e outros compostos endógenos, como cafeína e colesterol, é possível afirmar que a presença de tais compostos não interferiu na quantificação dos analitos, como representado na FIGURA 22. Isso se deve majoritariamente ao fato que os cromatogramas de íon extraído são obtidos a partir da massa exata dos analitos.

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA O TESTE DE ESPECIFICIDADE



CBZ – carbamazepina; DZP – diazepam; FXT – fluoxetina; HLP – haloperidol; TMP – trimetoprima.

FONTE: A autora (2019).

Ao realizar a extração das massas exatas dos interferentes, é possível afirmar que os mesmos também não coeluem com os analitos quando empregado o método cromatográfico desenvolvido. A TABELA 22 apresenta os dados dos tempos de retenção dos analitos e dos interferentes potenciais.

Dessa forma, é possível afirmar que o método analítico desenvolvido poderia ser empregado para a identificação de todos os analitos em análises de *screening*, sem que a identificação dos analitos seja comprometida pela presença dos interferentes avaliados.

TABELA 22 – TESTE DE ESPECIFICIDADE

Composto	Massa Exata (m/z)	Tempo de retenção (min)
Lamivudina	230,05939	6,52
<i>Trimetoprima</i>	<i>291,14517</i>	<i>7,69</i>
Cafeína	195,08765	8,04
Omeprazol	346,1220 ou 299,1087	9,02
Pantoprazol	384,0824 ou 200,0376	10,03
Lansoprazol	370,0832 ou 252,03006	10,23
Ibuprofeno	207,13796	10,37
<i>Haloperidol</i>	<i>376,14741</i>	<i>10,53</i>
Estriol	289,18037	10,82
<i>Fluoxetina-D6</i>	<i>316,17899</i>	<i>11,13</i>
<i>Fluoxetina</i>	<i>310,14133</i>	<i>11,15</i>
Sulfametoxazol	254,05939 ou 156,01138	11,2
<i>Carbamazepina</i>	<i>237,10224</i>	<i>12,46</i>
<i>Diazepam</i>	<i>285,07892</i>	<i>14,83</i>
Testosterona	289,21621	15,19
Estrona	271,16926	15,58
Diclofenaco	296,02396	16,62
Progesterona	315,23186	19,04
Estradiol	273,18491	20,32
Ácido Acetilsalicílico	181,05008	ND
Amoxicilina	366,11180	ND
Canabidiol	315,23186	ND
Colesterol	387,36269 ou 369,35213	ND
Etinilestradiol	279,17434 ou 319,1669	ND
Paracetamol	152,07060	ND
Reserpina	609,28070	ND
THC (tetraidrocanabinol)	315,23186	ND

Observação: analitos e padrão interno em itálico

ND: não detectado

4.3.4 Recuperação e fator de enriquecimento

A recuperação e fator de enriquecimento do método analítico desenvolvido foram avaliados fazendo uso de relações definidas para HF-LPME de sistemas de

duas fases, sendo influenciada diretamente pela razão entre os volumes das fases doadora e aceptora, assim como pelo coeficiente de partição do analito nestas duas fases.

Para realizar tais cálculos foram utilizadas as expressões descritas por Ho et al. (2002a), desenvolvidas para a HF-LPME de duas fases, empregando os volumes de 17 μ L e 10,0 mL como V_{org} e V_d , respectivamente. Os resultados obtidos para este estudo são apresentados na TABELA 23.

TABELA 23 – RECUPERAÇÃO E FATOR DE ENRIQUECIMENTO PARA O MÉTODO DESENVOLVIDO

Analito	log K_{ow}^a	Recuperação (%)	Fator de Enriquecimento
Carbamazepina	2,1	17,6	104
Diazepam	2,63	42,0	247
Fluoxetina	4,09	95,4	561
Haloperidol	3,7	89,5	526
Trimetoprima	1,26	3,00	17,7

K_{ow} – coeficiente de partição octanol-água

FONTE: a - DrugBank

Quando avaliados os valores obtidos para recuperação e fator de enriquecimento, devido à grande diferença entre os valores de K_{ow} para os analitos, é possível afirmar que estes refletem claramente a influência da polaridade do analito quando a extração é feita por HF-LPME de duas fases. A fluoxetina, que é o analito de menor polaridade apresenta uma taxa de recuperação cerca de 32 vezes maior do que a trimetoprima, o analito de maior polaridade. De acordo com Ho et al., (2002a), para os analitos com K_{ow} superiores a 500, como a fluoxetina e o haloperidol, as taxas de recuperação obtidas por HF-LPME de duas fases são comparáveis àquelas obtidas por LLE, com o benefício de um consumo de solventes orgânicos consideravelmente inferior, que por sua vez resulta em fatores de enriquecimentos mais elevados para a HF-LPME do que para a LLE.

Segundo a FDA, para que a recuperação de um método bioanalítico seja adequada, os valores não devem necessariamente ser próximos de 100%, porém a extração deve ser reprodutível (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Dessa forma, como citado anteriormente na seção 4.3.2, o método desenvolvido apresentou precisão e exatidão adequada para todos os analitos, de forma que

recuperações baixas, como é o caso da trimetoprima, não interferem com a aplicabilidade do método.

4.3.5 Diluição da amostra

Foram realizados experimentos de diluição na proporção 1:4 (v/v) de plasma:hidróxido de sódio pH 10,0 para verificar a aplicabilidade do método desenvolvido a amostras contendo os analitos em concentrações acima do limite superior de quantificação das curvas analíticas obtidas. Tais testes foram conduzidos ao se utilizar amostras de plasma humano branco fortificadas com os analitos a uma concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tal concentração foi selecionada por representar a porção intermediária da faixa terapêutica da carbamazepina, único analito para qual a curva não alcançou concentrações altas o suficiente para aplicação de monitoramento terapêutico de fármacos (SCHULZ et al., 2012).

A partir de fortificação de $50 \mu\text{L}$ de plasma a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, a amostra final teria concentração equivalente ao ponto de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ da curva analítica, de forma que esta foi considerada a concentração teórica para o cálculo de erro relativo e, conseqüentemente, exatidão da medida da diluição. Os resultados obtidos a partir de extrações em triplicata estão representados na TABELA 24.

TABELA 24 – RESULTADOS OBTIDOS PARA DILUIÇÃO DO PLASMA FORTIFICADO COM $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ NA PROPORÇÃO 1:4 (n=3)

Analito	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Erro Relativo (%)	RSD (%)
Carbamazepina	0,80	-20,2	15,6
Fluoxetina	0,96	-3,98	3,13
Haloperidol	1,19	19,4	9,01
Trimetoprima	0,77	-22,8	17,2

RSD – desvio padrão relativo.

De acordo com a Food & Drug Administration, para que a diluição seja aplicável a um método bioanalítico empregando técnicas cromatográficas, exatidão e precisão deve estar dentro do limite de $\pm 15\%$ (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Como é possível observar na TABELA 24, apenas para fluoxetina foram obtidos exatidão e precisão satisfatórias para a diluição na proporção 1:4 (v/v).

Tais resultados podem ser explicados devido à utilização da fluoxetina-D6 como padrão interno, que corrige de forma mais adequada as variações decorrentes do procedimento de extração e variações instrumentais para a própria fluoxetina, uma vez que estes compostos apresentam polaridade e teor de ligação com proteínas mais próximos quando comparados aos demais pares padrão interno-analito.

Assim, é possível afirmar que, dentre os cinco analitos avaliados neste estudo, para a fluoxetina é possível realizar a diluição da amostra na proporção de 1:4 (v/v). Devido à faixa da curva obtida e a possibilidade de diluição, o método desenvolvido é aplicável para este analito tanto para amostras de estudos clínicos quanto para amostras de toxicologia forense.

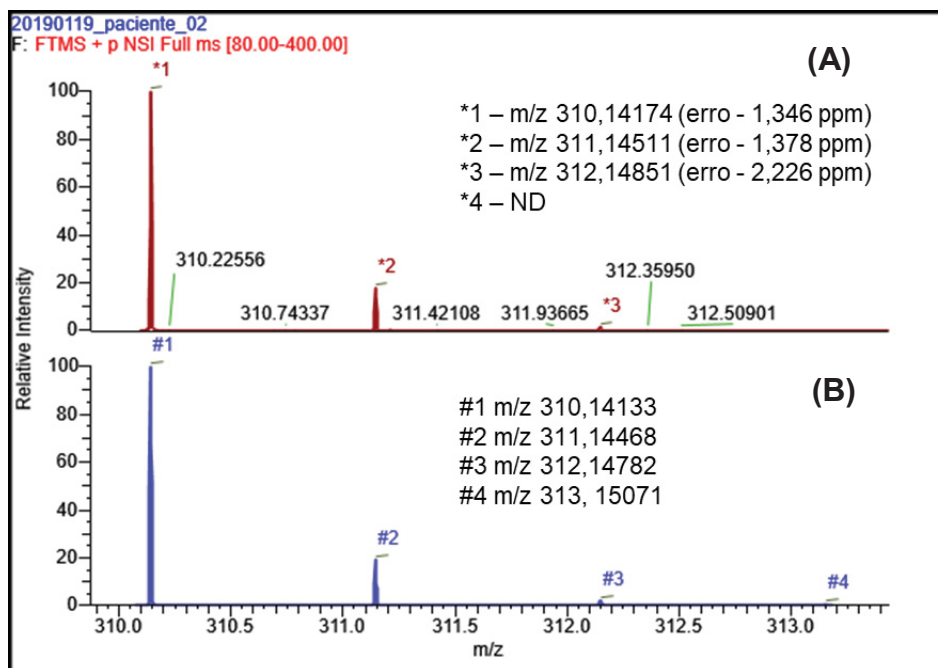
Também é possível afirmar que, devido à impossibilidade de realizar a diluição de amostras contendo carbamazepina sem afetar a exatidão e precisão do método, este analito não tem sua faixa terapêutica completamente coberta pelo método desenvolvido.

4.3.6 Aplicação do método a amostra de paciente em terapia com fluoxetina

Após a avaliação preliminar dos parâmetros de desempenho do método analítico desenvolvido, o mesmo foi aplicado a uma amostra de plasma humano, proveniente de um voluntário em terapia com fluoxetina, com o intuito de demonstrar a aplicabilidade do método a amostras de estudos clínicos. A este voluntário foi administrada uma dose diária de 20 mg do fármaco. Comparando-se a amostra do voluntário com o perfil isotópico de fluoxetina proveniente do banco de dados do software TraceFinder, 75% dos isótopos apresentaram confirmação com erro de massa inferior a 2,250 ppm, como é possível observar na FIGURA 23, fornecendo uma confirmação positiva do analito.

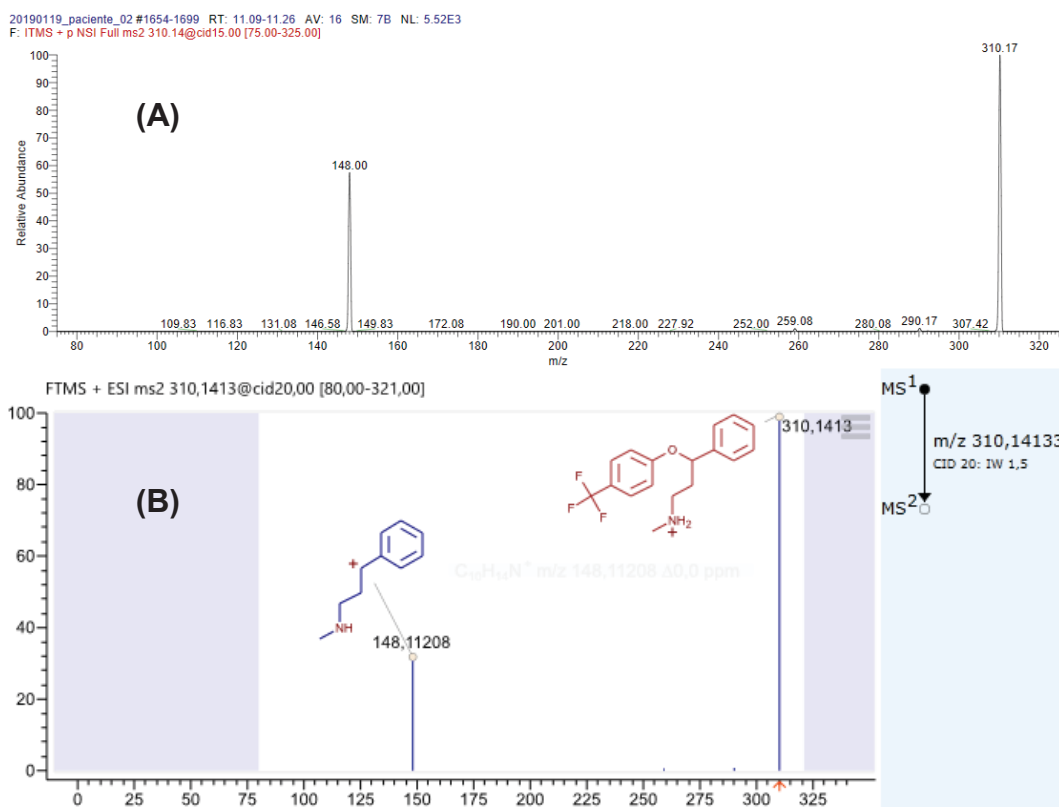
Adicionalmente, comparando-se os perfis de fragmentação do analito na amostra do voluntário com o obtido no banco de dados do site m/zCloud, foram observados os mesmos sinais, como representado na FIGURA 24. O íon de massa/carga 310 corresponde ao íon molecular protonado da fluoxetina, o íon de massa carga 148 corresponde ao íon produto formado após a dissociação induzida por colisão.

FIGURA 23 – PERFIL ISOTÓPICO PARA A FLUOXETINA, ONDE (A) ESPECTRO DA AMOSTRA DO VOLUNTÁRIO E (B) ESPECTRO DO BANCO DE DADOS DO TRACEFINDER v4.1



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 24 – ESPECTRO MS2 PARA FLUOXETINA, ONDE (A) AMOSTRA DO PACIENTE E (B) BANCO DE DADOS DO M/ZCLOUD

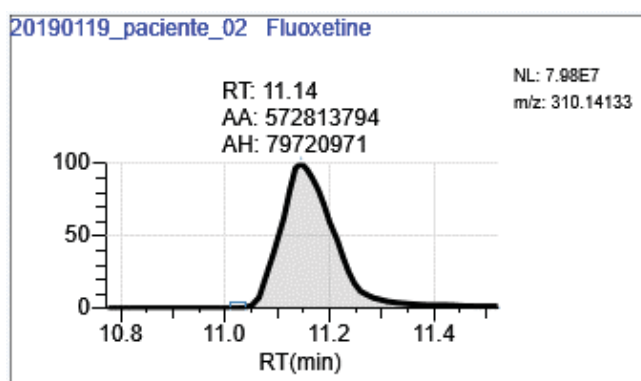


FONTE: (A) A autora (2019); (B) m/zCloud (2019).

A FIGURA 25 apresenta o cromatograma de íon extraído parcial obtido a partir da massa exata da fluoxetina, m/z 310,14133. Ao interpolar a resposta obtida na equação da reta referente à curva analítica, constatou-se que a amostra continha $103,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de fluoxetina. Este resultado é condizente com o apresentado na literatura, como pode ser observado no GRÁFICO 14, onde Djordjevic et al. (2005) monitoraram durante 10 semanas as concentrações plasmáticas de fluoxetina e seu metabólito, norfluoxetina, em amostras de paciente em terapia com 20 mg/diário de fluoxetina.

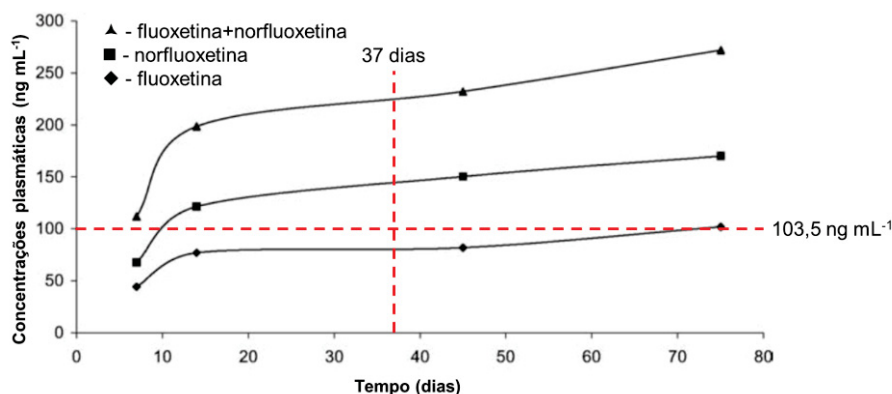
Na data de coleta, o voluntário estava em terapia com o fármaco há 37 dias, e ao realizar a extrapolação deste período e da concentração de fluoxetina determinada na amostra, é possível observar que a intersecção das duas retas está muito próxima do perfil traçado no GRÁFICO 14. O metabolismo da fluoxetina é realizado no fígado majoritariamente pela ação da enzima CYP2D6 (citocromo P450 2D6), a qual está sujeita a polimorfismos que distribuem uma população entre metabolizadores lentos e rápidos (KANDASAMY et al., 2010). No estudo de Djordjevic et al. (2005) os autores relatam que, devido esta variabilidade genética, as concentrações plasmáticas determinadas se encontram amplamente distribuídas entorno do valor médio apresentado no GRÁFICO 14, englobando a concentração determinada neste estudo.

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO PARCIAL DA AMOSTRA PROVENIENTE DO VOLUNTÁRIO EM TERAPIA COM FLUOXETINA (20 mg/DIÁRIOS)



FONTE: A autora (2019)

GRÁFICO 14 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS MÉDIAS DE FLUOXETINA (◆), NORFLUOXETINA (■) E A SOMA DE FLUOXETINA+NORFLUOXETINA (▲) OBSERVADAS DURANTE 10 SEMANAS PARA PACIENTES EM TERAPIA COM 20 mg DIÁRIAS DE FLUOXETINA



FONTE: Adaptado de Djordjevic et al. (2005).

Com base nestes dados, há indícios que o método analítico desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para a determinação de fluoxetina em amostras de pacientes em terapia com o fármaco, tanto para identificação quanto para quantificação.

Em relação à trimetoprima, para a qual o método desenvolvido apresenta potencialidade para aplicação para estudos clínicos, não foi possível recrutar voluntários em terapia com o fármaco.

Apesar de o método analítico desenvolvido não se mostrar satisfatório neste trabalho nas faixas de concentração terapêuticas para três dos fármacos selecionados, pequenas modificações potencialmente eliminariam os obstáculos da aplicação deste método a amostras de plasma humano em estudos clínicos. Dentre tais possíveis alterações, podemos citar a construção de uma curva analítica mais ampla para a carbamazepina, fracionada em curvas analíticas com faixas de concentração mais estreitas, assim como o estreitamento da faixa de concentração avaliada para o diazepam e, por fim, a obtenção de uma curva analítica com concentrações menores para o haloperidol juntamente com uma ressolubilização do extrato seco num volume inferior a 1,0 mL de ácido fórmico 0,10% (v/v).

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi avaliado um método analítico empregando nanoLC-MS e HF-LPME para a determinação de cinco fármacos em amostras de plasma, sendo que a união de tais técnicas de extração e de análise não foi relatada na literatura até o momento para nenhum tipo de matriz, seja ela de interesse ambiental ou clínico.

Unindo-se o uso de espectrometria de massas de alta resolução e diversas ferramentas de identificação, como perfil isotópico e perfil de fragmentação, da nanocromatografia líquida como técnica de separação e da HF-LPME como técnica de extração e *clean-up*, responsável pela eliminação de interferência de macromoléculas, como proteínas, o método desenvolvido pode ser aplicado de forma seletiva, em grande parte devido à possibilidade de controle de pH da fase doadora, e específica a análises de *screening* para todos os fármacos avaliados a partir de concentrações tão baixas quanto $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Além disso, devido ao uso de pequenos volumes de solvente orgânico, a técnica de HF-LPME apresentou vantagens quando comparada às técnicas clássicas de extração, como uma menor geração de resíduos da extração e fatores de enriquecimento elevados, principalmente para os analitos de menor polaridade, como a fluoxetina e o haloperidol.

Apesar de o método desenvolvido ser excelente para a identificação dos fármacos em amostras complexas, para três dos analitos este método não pode ser aplicado para sua quantificação em estudos clínicos, devido à não abrangência da faixa de concentração terapêutica para o haloperidol e para a carbamazepina e devido à não linearidade do método para o diazepam.

Já para a fluoxetina e trimetoprima, o método pode ser aplicado com sucesso a amostras de interesse clínico, como estudos de monitoramento terapêutico, destacando-se que, devido à possibilidade de diluição das amostras para a fluoxetina, a faixa de concentração avaliada pode ser estendida até pelo menos $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, permitindo o emprego do método desenvolvido a amostras de interesse a toxicologia forense.

O método foi aplicado a uma amostra de paciente em terapia com fluoxetina de forma bem-sucedida, onde foi determinada uma concentração plasmática do

fármaco de $103,5 \text{ ng mL}^{-1}$, teor coerente com os dados reportados previamente na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDETRAN. Impacto do uso de álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito. , 1997.
- ADAWAY, J. E.; KEEVIL, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC – MS / MS. **Journal of Chromatography B**, v. 883–884, p. 33–49, 2012.
- AHMED, R. G.; EL-GAREIB, A. W. Maternal carbamazepine alters fetal neuroendocrine-cytokines axis. **Toxicology**, v. 382, p. 59–66, 2017.
- ALCÁNTARA-DURÁN, J.; MORENO-GONZÁLEZ, D.; BENEITO-CAMBRA, M.; GARCÍA-REYES, J. F. Dilute-and-shoot coupled to nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for the determination of drugs of abuse and sport drugs in human urine. **Talanta**, v. 182, n. February, p. 218–224, 2018.
- ALTAMURA, A. C.; MORO, A. R.; PERCUDANI, M. Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 26, n. 3, p. 201–214, 1994.
- ALVES, M. M. DE O.; OLIVEIRA, C. DA S. P. DE. Dispensação de Antidepressivos em Farmácias do Setor Público e Privado do Município de Tijucas do Sul-PR. **Revista UNIANDRADE**, v. 16, n. 3, p. 160–166, 2014.
- ALVIM-JR, J.; LOPES, B. R.; CASS, Q. B. Simultaneous enantioselective quantification of fluoxetine and norfluoxetine in human milk by direct sample injection using 2-dimensional liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 120–126, 2016.
- ANDRADE, M. D. F.; CÉLIA, R.; ANDRADE, G. DE; SANTOS, V. Prescrição de psicotrópicos: avaliação das informações contidas em receitas e notificações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, 2004.
- ANVISA. Resolução RDC nº 166 - Validação de Métodos Analíticos. , 2017.
- AZEVEDO, Â. J. P. DE; ARAÚJO, A. A. DE; FERREIRA, M. Â. F. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras Consumption of anxiolytic benzodiazepines: a correlation between SNGPC data and sociodemographic indicators in Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 83–90, 2016.
- BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.
- BATH, K. G.; SCHARFMAN, H. E. Epilepsy & Behavior Impact of early life exposure to antiepileptic drugs on neurobehavioral outcomes based on laboratory animal and clinical research. **Epilepsy & Behavior**, v. 26, n. 3, p. 427–439, 2013.
- BERLIOZ-BARBIER, A.; BAUDOT, R.; WIEST, L.; et al. MicroQuEChERS – nanoliquid chromatography – nanospray – tandem mass spectrometry for the detection and quantification of trace pharmaceuticals in benthic invertebrates. **Talanta**, v. 132, p. 796–802, 2015.

BETTING, L. E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M. A.; et al. Tratamento de Epilepsia: Consenso dos Especialistas Brasileiros. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 1045–1070, 2003.

BÉVALOT, F.; CARTISER, N.; BOTTINELLI, C.; GUITTON, J.; FANTON, L. State of the art in bile analysis in forensic toxicology. **Forensic Science International**, v. 259, p. 133–154, 2016.

BINSUMAIT, I.; HADIDI, K.; RAGHIB, S. Stability of fluoxetine in stored plasma, aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection. **Pharmazie**, v. 56, n. 4, p. 311–313, 2001.

BLUE, L. E.; FRANKLIN, E. G.; GODINHO, J. M.; et al. Recent advances in capillary ultrahigh pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1523, p. 17–39, 2017.

BÖGER, B.; FEDERHEN, C.; BRAND, M.; et al. Medicamentos sujeitos a controle especial mais utilizados em centros de atenção psicossocial em uma cidade do Paraná. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 4, p. 84–97, 2017.

BONDE, S. L.; BHADANE, R. P.; GAIKWAD, A.; et al. Simultaneous determination of Olanzapine and Fluoxetine in human plasma by LC – MS / MS : Its pharmacokinetic application. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 90, p. 64–71, 2014.

BOSCH, M. E.; SÁNCHEZ, A. J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Analytical methodologies for the determination of omeprazole: An overview. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 4, p. 831–844, 2007.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CASSIANO, N. M. **Cromatografia Líquida - Novas Tendências e Aplicações**. 1^o ed. Elsevier - Campus, 2015.

CASTILLO-PEINADO, L. S.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Present and foreseeable future of metabolomics in forensic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 925, p. 1–15, 2016. Elsevier Ltd.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. SI. **Fundamentos de Cromatografia**. 1^a Edição ed. Editora Unicamp, 2006.

CRUZ, M. T.; CRUZ, E. L.; TORRES, J. R. P. Avaliação do uso de medicamentos psicotrópicos pelos pacientes da farmácia municipal de Terra Roxa d'Oeste/PR. **Revista Thêma et Scientia**, v. 5, n. 1, p. 131–137, 2015.

DECOSTERD, L. A.; WIDMER, N.; ANDRÉ, P.; AOURI, M.; BUCLIN, T. The emerging role of multiplex tandem mass spectrometry analysis for therapeutic drug monitoring and personalized medicine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 5–13, 2016.

DESOUBRIES, C.; CHAPUIS-HUGON, F.; BOSSÉE, A.; PICHON, V. Three-phase

hollow fiber liquid-phase microextraction of organophosphorous nerve agent degradation products from complex samples. **Journal of Chromatography B**, v. 900, p. 48–58, 2012.

DIELUBANZA, E. J.; SCHAEFFER, A. J. Urinary Tract infection in Women. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 1, p. 27–41, 2011.

DJORDJEVIC, S.; KOVACEVIC, I.; MILJKOVIC, B.; VUKSANOVIC, J.; POKRAJAC, M. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study. **II Farmaco**, v. 60, p. 345–349, 2005.

DONG, M. W.; ZHANG, K. Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 21–30, 2014.

DRUGBANK. DrugBank. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 22/1/2018.

VAN EECKHAUT, A.; 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, n. 23, p. 2198–2207, 2009.

ENGELAND, A.; MS, C.; SKURTVEIT, S.; MS, C.; MØRLAND, J. Risk of Road Traffic Accidents Associated With the Prescription of Drugs: A Registry-Based Cohort Study. **Annals of Epidemiology**, 2007.

FARIA, H. D. DE; ABRÃO, L. C. DE C.; SANTOS, M. G.; BARBOSA, A. F.; FIGUEIREDO, E. C. New advances in restricted access materials for sample preparation : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 959, p. 43–65, 2017.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2–13, 2014.

FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; ŠATÍNSKÝ, D.; ŠMÍDOVÁ, B.; SOLICH, P. Analysis of trace organic compounds in environmental , food and biological matrices using large-volume sample injection in column- switching liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 69–85, 2014.

FERREIRA, A.; RODRIGUES, M.; OLIVEIRA, P.; et al. Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine , lamotrigine , oxcarbazepine , phenobarbital , phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10 , 11-epoxide and licarbazepine. **Journal of Chromatography B**, v. 971, p. 20–29, 2014.

FERREIRA, L. A.; CHERVENAK, A.; PLACKO, S.; et al. Responses of polar organic compounds to are interrelated †. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 23347–23354, 2014.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 44–62, 2017.

FISICHELLA, M.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. High-throughput dispersive liquid / liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs

of abuse , benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS / M. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 33–41, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. , 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>>. .

FREITAS-LIMA, P. DE; BALDONI, A. DE O.; ALEXANDRE, V.; PEREIRA, L. R. L.; SAKAMOTO, A. C. Drug utilization profile in adult patients with refractory epilepsy at a tertiary referral center. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 11, p. 856–861, 2013.

FREITAS, D. F. DE; EDUARDO, C.; PORTO, D.; et al. Three-phase , liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 170–177, 2010.

GAMA, M. R.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Nano-Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Research. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 7, p. 694–703, 2013.

GJELSTAD, A.; JENSEN, H.; EINAR, K.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 742, p. 10–16, 2012.

GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction – principles , performance , applicability , and future directions. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 181–189, 2013.

GOKTAS, U.; KATI, I.; YUCE, H. H. Management of a severe carbamazepine overdose with continuous venovenous hemodiafiltration. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 28, n. 2, p. 260.e1-260.e2, 2010.

GRAPP, M.; KAUFMANN, C.; STREIT, F.; BINDER, L. Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography -quadrupole-time-of- flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 287, p. 63–73, 2018.

GRUBER, J.; MAZON, L. M. A Prevalência na Utilização de Medicamentos Psicotrópicos no Município de Mafra: um estudo retrospectivo. **Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 44–50, 2014.

GUILHAUS, M.; MLYNSKI, V.; SELBY, D. Perfect Timing : Time-of-flight Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 951–962, 1997.

HANSEN, L. M.; MEGERIAN, G.; DONNENFELD, A. E. Haloperidol Overdose During Pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 90, n. 4, p. 659–661, 1997.

HARRIS, E. C.; BARRACLOUGH, B. Suicide as an outcome for mental disorders - A meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 170, p. 205–228, 1997.

HENNEY, H. R.; SPERLING, M. R.; RABINOWICZ, A. L.; et al. Assessment of pharmacokinetics and tolerability of intranasal diazepam relative to rectal gel in healthy adults. **Epilepsy Research**, v. 108, n. 7, p. 1204–1211, 2014.

HERON, V.; AFIF, W. Update on Therapeutic Drug Monitoring in Crohn's Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 3, p. 645–659, 2017.

HO, J. M. W.; JUURLINK, D. N. Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. **Canadian Medical Association Journal**, v. 183, n. 16, p. 1851–1858, 2011.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction Comparison with conventional liquid – liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 3–17, 2002.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **The Analyst**, v. 127, p. 608–613, 2002.

HORTA, R. P.; AMARAL, B.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; SILVA, B. J. G. Evaluation of a Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction Technique for the Simultaneous Determination of PPI Drugs in Human Plasma by. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, n. 6, p. 564–573, 2018.

HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422–1428, 1967.

HUANG, C.; FREDRIK, K.; GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis (2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 80–87, 2016.

HYDE, A. M.; ZULTANSKI, S. L.; WALDMAN, J. H.; et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research & Development**, v. 21, p. 1355–1370, 2017.

ISHII, D.; ASAI, K.; HIBI, K.; JONOKUCHI, T.; NAGAYA, M. A study of micro-high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 144, n. 2, p. 157–168, 1977.

JUROWSKI, K.; KOCHAN, K.; WALCZAK, J.; et al. Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics: State of the art. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, n. 2005, p. 276–289, 2017.

KANDASAMY, M.; TRIPATHY, K.; RAVI, S.; et al. Unsuspected poor metabolizer phenotypes of fluoxetine in bioavailability/bioequivalence studies from an Indian population perspective. **Arzneimittelforschung**, v. 60, n. 1, p. 12–21, 2010.

KARLSSON, K. ERIK; NOVOTNY, M. Separation Efficiency of Slurry-Packed Liquid Chromatography Microcolumns with Very Small Inner Diameters. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 1662–1665, 1988.

KATAGIRI, H.; TAKITA, Y.; TOHEN, M.; et al. Efficacy and safety of olanzapine in the treatment of Japanese patients with bipolar I disorder in a current manic or mixed episode: A randomized, double-blind, placebo- and haloperidol-controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, n. 3, p. 476–484, 2012.

KAUFMANN, A. Combining UHPLC and high resolution MS: A viable approach for the analysis of complex samples? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 113–128, 2014.

KELLER, B. O.; SUI, J.; YOUNG, A. B.; WHITTAL, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 7, p. 71–81, 2008.

KHEL, A.; AZZOUZ, M.; ABTROUN, R.; REGGABI, M.; ALAMIR, B. Antipsychotic-induced disorders: Reported cases and prospective study on muscle biomarkers after high exposure to haloperidol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 352, n. May, p. 1–8, 2018.

KURTZ, S.; HERNANDEZ, A. E.; KOUROUNI, I.; PAREKH, K.; SALONIA, J. Holding on by a Breath: Carbamazepine Overdose and Neurologic Dysfunction. **CHEST**, v. 152, n. 4, p. A255, 2017.

LE-MINH, N.; STUETZ, R. M.; KHAN, S. J. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 89, p. 407–416, 2012.

LETSEKA, T.; GEORGE, M. J. Towards coupling dispersive liquid-liquid microextraction with hollow fibre liquid phase microextraction for extraction of organic pollutants of agricultural origin. **Analytical Chemistry Research**, v. 10, p. 28–32, 2016.

LI, J.; SHI, Q.; JIANG, Y.; LIU, Y. Pretreatment of plasma samples by a novel hollow fiber centrifugal ultrafiltration technique for the determination of plasma protein binding of three coumarins using acetone as protein binding releasing agent.pdf. **Journal of Chromatography B**, v. 1001, p. 114–123, 2015.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17–63, 2000.

LU, C. Y.; ZHANG, F.; LAKOMA, M. D.; et al. Changes in antidepressant use by young people and suicidal behavior after FDA warnings and media coverage: quasi-experimental study. **The BMJ**, v. 348, p. 1–11, 2014.

MACHADO, F. B.; POÇAS, C. A.; MELLA, E. A. C. Determinação dos antipsicóticos prescritos no Hospital Municipal de Maringá Determination of the antipsychotics prescribed in Maringá Municipal Hospital. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 1, p. 67–76, 2009.

MAGYAR, J.; RUSZNÄK, Z.; HARASZTOSI, C.; KÖRTVÉLY, A. Differential effects of fluoxetine enantiomers in mammalian neural and cardiac tissues. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 535–542, 2003.

MAHBOOB, S.; MOHAMEDALI, A.; AHN, S. B.; et al. Is isolation of comprehensive human plasma peptidomes an achievable quest? **Journal of Proteomics**, v. 127, p.

300–309, 2015.

MAHJOUR, A. EL; STAUB, C. Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 1057–1063, 2000.

MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3938–3945, 2010.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF - LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2014.

MEYER-MASSETTI, C.; CHENG, C. M.; SHARPE, B. A.; MEIER, C. R.; GUGLIELMO, B. J. The FDA Extended Warning for Intravenous Haloperidol and Torsades de Pointes: How Should Institutions Respond? **Journal of Hospital Medicine**, v. 5, n. 4, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV**. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes**. 2010.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; PUDAGE, A.; SHAH, A.; SHRIVASTAV, P. S. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in microgram quantities from low plasma volume by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 94, n. 2, p. 130–138, 2010.

MOHAMED, A.; ALSHARIF, A.; TAN, G.; CHOO, Y.; LAWAL, A. Efficiency of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Chromatography Methods in the Separation of Organic Compounds : A Review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378–391, 2017.

MOORE, K. H. P.; YUEN, G. J.; RAASCH, R. H.; et al. Pharmacokinetics of lamivudine administered alone and with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 59, n. 5, p. 550–558, 1996.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; PÉREZ-ORTEGA, P.; GILBERT-LÓPEZ, B.; et al. Evaluation of nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 78–87, 2017.

MORENO, J.; BELMONT, A.; JAIMES, O.; et al. Pharmacokinetic study of carbamazepine and its carbamazepine 10,11- epoxide metabolite in a group of female epileptic patients under chronic treatment. **Archives of Medical Research**, v. 35, n. 2, p. 3–4, 2004.

MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 263–273, 2007.

NAYAK, R. K.; DOOSE, D. R.; NAIR, N. P. V. The Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral and Depot Intramuscular Haloperidol in Schizophrenic

Patients. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 144–150, 1987.

NAZARIO, C. E. D.; FUMES, B. H.; DA SILVA, M. R.; LANÇAS, F. M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.

NAZARIO, C. E. D.; SILVA, M. R.; FRANCO, M. S.; LANÇAS, F. M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 18–37, 2015.

NI, X. J.; WANG, Z. Z.; SHANG, D. W.; et al. Simultaneous analysis of olanzapine, fluoxetine, and norfluoxetine in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, n. January, p. 506–514, 2018.

NIESSEN, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 179–197, 1999.

NOGA, M.; SUCHARSKI, F.; SUDER, P.; SILBERRING, J. A practical guide to nano-LC troubleshooting. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 14, p. 2179–2189, 2007.

NOVOTNY, M.; TSUDA, T. Packed Microcapillary Columns in High Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 271–275, 1978.

OELLERICH, M.; KANZOW, P.; WALSON, P. D. Therapeutic drug monitoring – Key to personalized pharmacotherapy. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 7–8, p. 375–379, 2017.

OLIVEIRA, A. F. F.; FIGUEIREDO, E. C. DE; SANTOS-NETO, Á. J. DOS. Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid-phase microextraction and injection port derivatization GC – MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 53–58, 2013.

PAGEL, J. F. Drug-Induced Hypersomnolence. **Clinics in Sleep Medicine**, v. 12, n. 3, p. 383–393, 2017.

PAN, R. N.; CHEN, T. H.; HUANG, C. S. H.; HSIONG, C. H. Pharmacokinetics and bioequivalent study of generic fluoxetine capsules preparation. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 1, p. 13–17, 2002.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid – liquid extraction. **Journal of Chromatography - Biomedical Applications**, v. 1184, p. 132–142, 2008.

PHAM, V. T.; NGUYEN, T. Q.; DAO, U. P. N.; NGUYEN, T. T. On the interaction between fluoxetine and lipid membranes: Effect of the lipid composition. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191,

p. 50–61, 2018.

PINTO, M. A. L.; SOUZA, I. D. DE; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116–124, 2017.

PORTO, C. E. D.; MAIA, P. P.; FREITAS, D. F. DE; et al. Liquid-phase microextraction for simultaneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 72–76, 2012.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 11–19, 2009.

QUEIROZ, R. H. C.; BERTUCCI, C.; MALFARÁ, W. R.; et al. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 428–434, 2008.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology**. 2016.

RIEUX, L. **A nanoLC-MS-based platform for peptide analysis**, 2006. University of Groningen.

ROBERTS, J. A.; ABDUL-AZIZ, M. H.; LIPMAN, J.; et al. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 498–509, 2014.

ROUINI, M.; ARDAKANI, Y. H.; MOGHADDAM, K. A.; SOLATANI, F. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 671–676, 2008.

SCAHILL, L.; KING, R. A.; LECKMAN, J. F.; HARRIS, N. Contemporary approaches to the treatment of tics in Tourette syndrome Abordagem contemporânea para o tratamento de tiques na síndrome de Tourette. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 4, p. 189–193, 2000.

SCHEIFE, R. T. Protein binding: what does it mean? **The annals of pharmacotherapy**, v. 23, n. 8, p. 27–31, 1989.

SCHULZ, M.; IWERSEN-BERGMANN, S.; ANDRESEN, H.; SCHMOLDT, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1 , 000 drugs and other xenobiotics. **Critical Care**, v. 16, n. 4, p. R136, 2012.

SCHÜTZE, G.; SCHWARZ, M. J. Therapeutic Drug Monitoring for individualised risk reduction in psychopharmacotherapy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 14–22, 2016.

SERRALHEIRO, A.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; ROCHA, M.; FALCÃO, A. First HPLC – UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital , primidone , phenytoin , carbamazepine , oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 925, p. 1–9, 2013.

SESTÁK, J.; MORAVCOVÁ, D.; KAHLE, V. Instrument platforms for nano liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 2–17, 2015.

SHARIFI, V.; ABBASI, A.; NOSRATI, A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid e liquid microextraction techniques in analytical toxicology. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 2, p. 264–276, 2015.

SHARMA, S.; KUKRETI, P.; KATARIA, D. Sedative hypnotics overdose: Epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Specialities**, v. 9, n. 3, p. 134–139, 2018.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis : A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1409–1421, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 9ª Edição ed. Cengage Learning, 2015.

SMALLWOOD, I. M. **Handbook of Organic Solvent Properties**. 1996.

SMITH, M. P.; BLUTH, M. H. Forensic Toxicology: An Introduction. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 753–759, 2016.

SOUZA, I. D. DE; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 140, p. 166–175, 2015.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699–711, 2004.

SUN, W.; QU, S.; DU, Z. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of naloxone , buprenorphine and norbuprenorphine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 952, p. 157–163, 2014.

SUTHERLAND, F. C. W.; BADENHORST, D.; JAGER, A. D. DE; et al. Sensitive liquid chromatographic – tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 914, p. 45–51, 2001.

SWARTZ, M. HPLC Detectors: A Brief Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 1130–1150, 2010.

TAKAMIYA, M.; AOKI, Y.; NIITSU, H.; SAIGUSA, K. A case of carbamazepine overdose with focal myocarditis. **Legal Medicine**, v. 8, p. 243–247, 2006.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. HPLC Analysis of Biomolecules Technical Guide. , 2010.

ULRICH, S.; MARTENS, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 696, p. 217–234, 1997.

VAIKKINEN, A.; REJ, J.; VRKOSLAV, V.; KAUPPILA, T. J.; CVA, J. Feasibility of desorption atmospheric pressure photoionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry to monitor urinary steroid metabolites during pregnancy. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 84–92, 2015.

VERINGA, A.; STURKENBOOM, M. G. G.; DEKKERS, B. G. J.; et al. LC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring of anti-infective drugs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 34–40, 2016.

WALTER, T. H.; ANDREWS, R. W. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 14–20, 2014.

WU, G.; ZHOU, H.; SHENTU, J.; HE, Q.; YANG, B. Determination of lansoprazole in human plasma by rapid resolution liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study on Chinese volunteers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 5, p. 1485–1489, 2008.

XIAN, F.; HENDRICKSON, C. L.; MARSHALL, A. G. High Resolution Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 708–719, 2012.

XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS / MS-based metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, p. 1–14, 2012.

XIAO, Q.; HU, B.; DUAN, J.; HE, M.; ZU, W. Analysis of PBDEs in Soil, Dust, Spiked Lake Water, and Human Serum Samples by Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction Combined with GC-ICP-MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 10, p. 1740–1748, 2007.

XU, R. N.; FAN, L.; RIESER, M. J.; EL-SHOUBAGY, T. A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC – MS / MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 342–355, 2007.

YUAN, C.; CHEN, D.; WANG, S. Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 119–125, 2015.

ZHANG, L.; WU, P.; JIN, Q.; HU, Z.; WANG, J. Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1072, p. 305–314, 2018.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Bruno José Gonçalves da Silva, orientador, Beatriz Isabella Cestaro, aluna de pós-graduação, da Universidade Federal do Paraná, e Michel Batista, coorientador, do Instituto Carlos Chagas, estamos convidando você, paciente, a participar de um estudo intitulado "Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de fármacos em amostras de plasma por nanoLC-MS/MS", onde será proposto um método de análise para determinar a quantidade dos fármacos de carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em amostras de plasma humano, o qual abriria possibilidades de análise de fármacos em amostras biológicas, como plasma, sangue e urina, utilizando materiais baratos e com uma metodologia capaz de identificar e determinar o teor de tais fármacos em baixas quantidades de forma confiável, tanto em exames para acompanhamento de um tratamento quanto para estudos de toxicidade de um medicamento.

- a) O objetivo desta pesquisa é desenvolver um método de análise para determinar a quantidade dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em amostras de plasma humano.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário o procedimento de coleta de amostras de sangue, sem a necessidade de período de jejum, a partir das quais será isolado o plasma para posterior análise.
- c) Para tanto você deverá comparecer no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFPR, localizada no Campus Botânico, Avenida Lothario Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba, para coleta de 8,5 mL de sangue, o que levará aproximadamente 30 minutos.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a mal estar temporário, como tontura, queda de pressão arterial e enjoo, dor no procedimento de coleta.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser desconforto durante o procedimento de coleta.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são desenvolvimento de uma metodologia para determinar a quantidade dos fármacos selecionados em plasma humano que, devido ao emprego de uma técnica de microextração, a qual minimiza o uso de substâncias nocivas para retirar os fármacos do plasma após a coleta, resultando em um menor impacto ambiental, assim como uma pequena quantidade de amostra biológica, diminuindo o volume de sangue necessário na coleta. Adicionalmente, a técnica de microextração é uma técnica de baixo custo e simples. Em seguida, esta metodologia poderá ser aplicada em estudos clínicos e farmacológicos, como estudos de toxicidade e de acompanhamento de tratamento.
- g) Os pesquisadores Bruno José Gonçalves da Silva e Beatriz Isabella Cestaro responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Departamento de Química da UFPR, localizado no Campus Centro Politécnico, Avenida Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Jardim das Américas, Curitiba, no Laboratório do Grupo de Cromatografia e Técnicas de Extração, bruno@quimica.ufpr.br ou beatrizicestaro@gmail.com, 3361-3299 ou 3524-2211, e Michel Batista poderá ser localizado na Plataforma de Espectrometria de Massas, localizada no Instituto Carlos Chagas, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 – CIC, Curitiba, michel.batista@fiocruz.br, 3316-3230, no horário das 8h às 17h, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
 Parecer CEP/SD-PR, nº 2675187
 na data de 25/05/2018 gka

Pais ou Responsável Legal
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE
 Orientador

- h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o orientador e pós-graduanda deste estudo. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.
- j) O material obtido – amostras biológicas – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será devidamente encaminhados à Divisão de Gestão Ambiental, órgão da SUINFRA-UFPR, para descarte ao término do estudo, dentro de 11 meses.
- k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como materiais de coleta e análise da amostra biológica, assim como o transporte da mesma, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- l) Você terá a garantia de que problemas, como mal estar, tontura, queda de pressão arterial e enjoo, e dor no procedimento de coleta, decorrentes do estudo, serão tratados no local de coleta.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- n) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

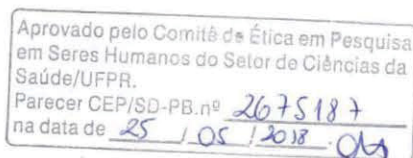
Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. Fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum dos problemas relacionados no item L.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de ____

Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

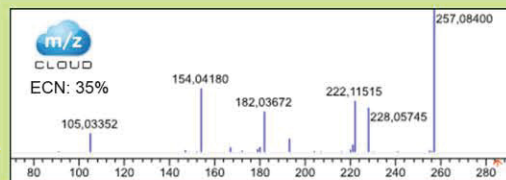
Beatriz Isabella Cestaro



APÊNDICE B – FERRAMENTAS EMPREGADAS NA IDENTIFICAÇÃO DO DIAZEPAM, FLUOXETINA, HALOPERIDOL E TRIMETOPRIMA

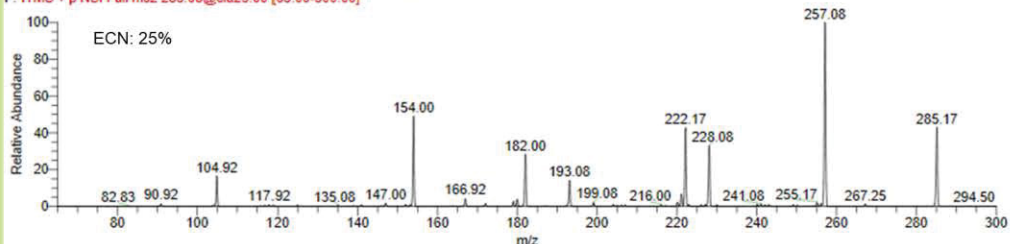
DIAZEPAM

- MS1:
 - Massa exata: m/z 285,07892
 - Massa encontrada: m/z 285,07906
 - Erro de massa médio: 0,49415 ppm



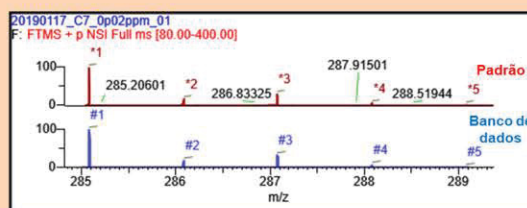
- MS2

20190117_C7_op02ppm_01 #2396-2443 RT: 14.68-14.90 AV: 24 NL: 1.71E4
F: ITMS + p NSI Full ms2 285.08@cid25.00 [65.00-300.00]



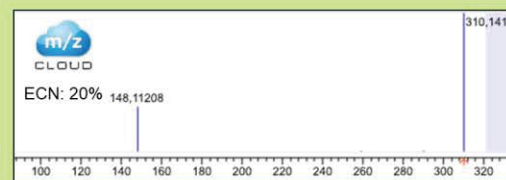
- Perfil isotópico: 100%

Sinal	Massa exata (m/z)	Massa encontrada (m/z)	Erro (ppm)
1	285,07892	285,07905	0,450
2	286,08227	286,08237	0,371
3	287,07598	287,07611	0,462
4	288,07932	288,07944	0,421
5	289,08242	289,08276	1,176



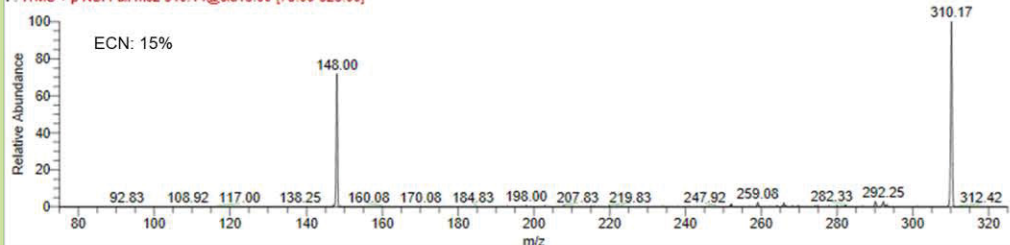
FLUOXETINA

- MS1:
 - Massa exata: m/z 310,14133
 - Massa encontrada: m/z 310,14185
 - Erro de massa médio: 1,6628 ppm



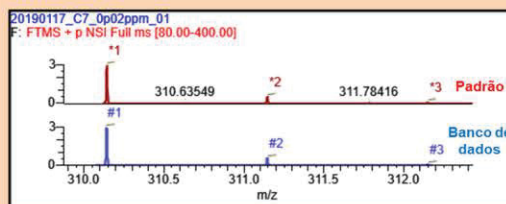
- MS2

20190117_C7_op02ppm_01 #1656-1683 RT: 11.12-11.22 AV: 9 NL: 6.03E2
F: ITMS + p NSI Full ms2 310.14@cid15.00 [75.00-325.00]



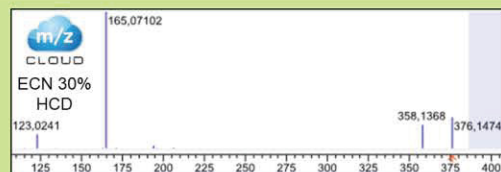
- Perfil isotópico: 100%

Sinal	Massa exata (m/z)	Massa encontrada (m/z)	Erro (ppm)
1	310,14133	310,14181	1,575
2	311,14458	311,14526	1,866
3	312,14781	312,14849	2,167



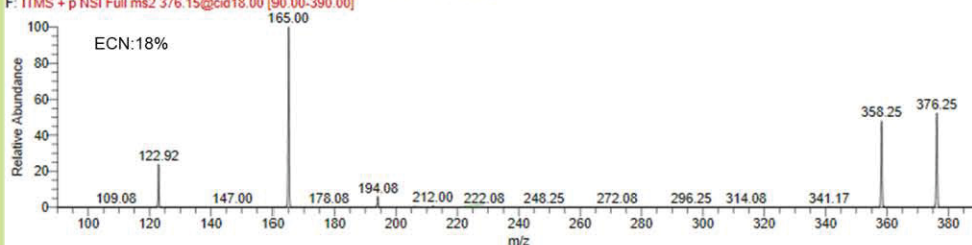
HALOPERIDOL

- MS1:
 - Massa exata: m/z 376,14741
 - Massa encontrada: m/z 376,14780
 - Erro de massa médio: 1,0279 ppm



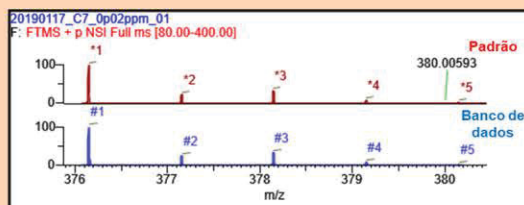
- MS2

20190117_C7_0p02ppm_01 #1526-1552 RT: 10.48-10.61 AV: 14 NL: 1.71E4
 F: ITMS + p NSI Full ms2 376.15@cid18.00 [90.00-390.00]



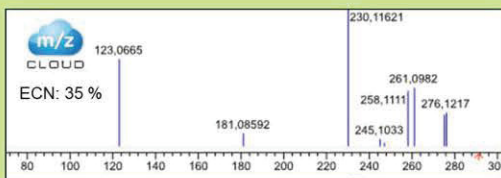
- Perfil isotópico: 100%

Sinal	Massa exata (m/z)	Massa encontrada (m/z)	Erro (ppm)
1	376,14741	376,14756	0,395
2	377,15076	377,15106	0,797
3	378,14458	378,14469	0,311
4	379,14786	379,14816	0,794
5	380,15087	380,15087	0,659



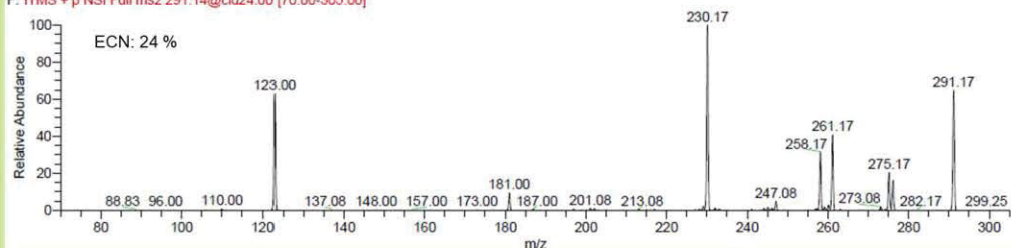
TRIMETOPRIMA

- MS1:
 - Massa exata: m/z 291,14517
 - Massa encontrada: m/z 291,14544
 - Erro de massa médio: 0,91571 ppm



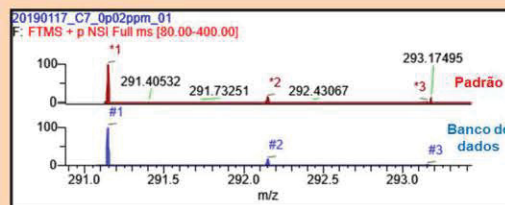
- MS2

20190117_C7_0p02ppm_01 #911-936 RT: 7.46-7.58 AV: 13 NL: 3.11E3
 F: ITMS + p NSI Full ms2 291.14@cid24.00 [70.00-305.00]



- Perfil isotópico: 100%

Sinal	Massa exata (m/z)	Massa encontrada (m/z)	Erro (ppm)
1	291,14517	291,14540	0,783
2	292,14848	292,14861	0,434
3	293,15089	293,15193	3,522



ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DA SAÚDE DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Técnica de Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca na Determinação de Fármacos em Amostras de Plasma por nanoLC-MS/MS

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87313218.7.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de pós graduação em química

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.675.187

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da Técnica de Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca na Determinação de Fármacos em Amostras de Plasma por nanoLC-MS/MS" do Pesquisador responsável Bruno José Gonçalves da Silva, tendo como colaboradores Beatriz Isabella Cestaro e Michel Batista.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Determinação dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em amostras de plasma humano empregando microextração em fase líquida com fibra oca por nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

Objetivos Específicos

- Desenvolver o método cromatográfico (nanoLC-MS/MS) para a determinação dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima;
- Otimizar das condições de extração por microextração em fase líquida com fibra oca;
- Avaliar os principais parâmetros de mérito do método desenvolvido em amostras de plasma humano;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de plasma de pacientes em terapia com estes fármacos.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quais os benefícios, diretos ou indiretos, para a população e a sociedade?

O principal benefício deste projeto é o desenvolvimento de um protocolo analítico para determinação dos fármacos selecionados em plasma humano que, devido ao emprego de uma técnica de microextração, utiliza volumes reduzidos de solventes orgânicos, resultando em um menor impacto ambiental, e de amostra biológica. Adicionalmente, a microextração em fase líquida com fibra oca é uma técnica de baixo custo e simples. Após a validação, este protocolo poderá ser aplicado em estudos clínicos e farmacológicos, empregados visando estudos de toxicidade e monitoração terapêutica.

Quais os riscos inerentes ou decorrentes da pesquisa?

Os voluntários podem estar sujeitos a pequenos desconfortos durante a coleta de sangue, como mal estar temporário, queda de pressão arterial, tontura e enjôo.

Qual a possibilidade da ocorrência?

A possibilidade de ocorrência para estes riscos é mínima, e os participantes poderão se retirar do estudo a qualquer momento.

Quais as medidas para sua minimização e proteção do participante da pesquisa?

A coleta de sangue, cerca de 8,5 mL de amostra, será realizada no Laboratório Escola de Análises Clínicas - LEAC, que atua de acordo com a regulamentação da Vigilância Sanitária. Para minimizar os riscos da coleta de amostras de sangue, o profissional que realizará a coleta usará luvas descartáveis e jaleco, os materiais de coleta são esterilizados e descartáveis. O procedimento será iniciado no momento em que o voluntário estiver confortável e acomodado em uma cadeira adequada, e pode ser interrompido a qualquer momento se o mesmo desistir de participar da pesquisa. No caso de mal estar eventual, a coleta será imediatamente interrompida e o voluntário receberá auxílio de profissionais capacitados, como a Prof. Dr^a Aline Borsato Hauser, responsável pelo laboratório de coleta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As soluções estoque dos analitos e do padrão interno serão preparadas individualmente em metanol na concentração de 1 g L⁻¹, e posteriormente serão armazenadas tudo de ensaio envoltos em papel alumínio, para evitar exposição à luz, a -20 °C. Os padrões de alta pureza (>98%) de carbamazepina, diazepam, haloperidol, cloridrato de fluoxetina foram adquiridos da United States Pharmacopeia, USP (São Paulo, Brasil), e a trimetoprima foi fornecida pelo laboratório farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil),

Os demais reagentes necessários para a preparação de soluções da fase móvel e solventes

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

utilizados na separação cromatográfica e empacotamento de colunas (Acetonitrila e Metanol - grau HPLC) e na técnica de extração são de alta pureza. A água utilizada nos ensaios será purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore® (São Paulo, Brasil).

As amostras de plasma, branco de referência, serão enriquecidas com volumes apropriados das soluções-padrão dos analitos em diferentes concentrações, as quais resultarão em concentrações plasmáticas que incluem os níveis terapêuticos. Estas amostras de plasma, que serão gentilmente cedidas pela Laboratório Escola de Análises Clínicas - LEAC / UFPR (declaração em anexo), serão utilizadas na etapa de validação do método HF-LPME/nanoLC-MS/MS proposto.

Após seleção das amostras de plasma, o condicionamento seguro do material biológico será realizado no local da coleta em recipientes de material inerte, rotulados, à prova de vazamento, que conterá o material a ser transportado. Os recipientes serão então armazenados em caixa térmica (resfriada com gelo reciclável, contido em sacos plásticos resistentes e vedados), de material resistente para proteger o conteúdo de influências externas como da exposição à água e danos físicos durante o transporte. O transporte terrestre será realizado da LEAC ao Instituto Carlos Chagas – Fococruz/PR em automóvel, sendo imediatamente acondicionado em freezer até sua adequada manipulação pela equipe da pesquisa.

O armazenamento será em freezer laboratorial a -22° C, até o momento da execução das etapas do projeto. As amostras biológicas coletadas serão de uso específico para essa pesquisa e serão destruídas ao término do estudo em 11 meses.

Entretanto, na fase inicial de testes, será utilizado um plasma sintético que consistirá em solução de alta viscosidade preparada a partir de eletrólitos e proteínas semelhantes àquelas encontradas em plasma humano, como descrito na Tabela 1, que será armazenado a 4°C e utilizado no prazo de duas semanas, conforme descrito na literatura. Este estudo permitirá a compreensão quanto o processo de partição dos fármacos entre as fases doadoras e receptoras na etapa de extração, além de avaliar o efeito de matriz durante a validação do método.

As nanocolunas analíticas empregadas nas análises por nanoLC-MS/MS, que consiste de um cromatógrafo a líquido de ultraperformance NanoACQUITY e espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo e tempo de voo ("Nano-Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight", nanoLC-Qtof - Waters®), serão produzidas na Plataforma de Espectrometria de Massas, empregando capilares de sílica recoberta por poliimida com diâmetro interno 75 µm e diâmetro externo 375 µm (Polymicro Technologies).

O capilar deve ser preso no Laser-Based Micropipette Puller P-2000 (Sutter Instrument Company), equipado com um laser pulsante de CO₂ que realizará o corte e dará origem a ponta da coluna.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

Para confeccionar uma coluna de 15 cm, o capilar deve ser preenchido com 20 mg de octadecilsilano (C18) de 2,4 μm e porosidade de 120 \AA (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH), pesados em balança analítica. A coluna será conectada a pressure injection cell contendo as partículas de C18, que por sua vez é conectada a uma bomba pneumohidráulica. O sistema será pressurizado até 5000 psi, e mantido sob pressão até que o acúmulo de partículas atinja a marca dos 15 cm. Em seguida, a coluna é empacotada em cromatógrafo a líquido (Eksigent nanoLC Ultra 1D Plus) através de ciclos em que a percolação de fase móvel é alternada entre água e acetonitrila, ambas contendo o aditivo ácido fórmico a uma concentração de 0,1%.

Serão otimizadas as condições de ionização e fragmentação para ionização no modo positivo (energia de ionização, energia de colisão, voltagem do cone, vazão e temperatura do gás secante), assim como será otimizado o método cromatográfico, avaliando parâmetros como tempo de análise, tempo de carregamento da amostra, vazão e composição da fase móvel.

Para os estudos de microextração será empregada uma fibra oca porosa de polipropileno (Q3/2 Accurel) com diâmetro interno de 600 μm , espessura da parede de 200 μm e tamanho de poros de 0,2 μm , adquiridas pelo fornecedor Membrana® (Wuppertal, Alemanha). Os pedaços de fibra serão descontaminados com acetona antes da realização do procedimento de extração, que será realizado de acordo com o representado na Figura 1.

A otimização do processo HF-LPME será realizada em solução contendo amostra de plasma sintético, como descrito anteriormente, e solução de hidróxido de amônio para controle de pH do meio. Será realizada a avaliação dos parâmetros de extração, como sistema de 2 ou 3 fases, solvente orgânico que comporá a MLS, tempo, temperatura e agitação durante a extração, pH e volume das soluções doadora e aceptora, e comprimento da fibra oca.

Após o processo de extração e com auxílio de uma seringa de cromatografia líquida, a fase aceptora será recolhida e os analitos serão ressuspensos em uma solução de ácido fórmico 0,1% em água ultrapura, para posterior injeção no sistema cromatográfico.

A validação dos métodos analíticos padronizados, como preconizados pela ANVISA, será realizada utilizando-se amostras de branco de referência enriquecidas com os analitos em estudo em diferentes concentrações, avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, especificidade, precisão, exatidão, recuperação e robustez. Por fim, o método padronizado e validado será aplicado em amostras reais de plasma para determinação simultânea dos fármacos selecionados.

Serão convidados alunos matriculados na Graduação e no Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR através de um e-mail distribuído pelo Departamento de Química. O contato/convide para

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

a participação como voluntário deste trabalho será realizado via email (email institucional da UFPR do pesquisador principal) Os esclarecimentos serão apresentados na forma de uma conversa simples, solicitando a participação voluntária de indivíduos em terapia dos fármacos selecionados, por indicação clínica, para fornecer as amostras reais, explicando de maneira simples e concisa os objetivos do estudo e qual será sua participação no projeto de pesquisa. Sendo que, após a concordância com a participação, será apresentada o TCLE e explicado os detalhes do projeto, e com a concordância final do participante, será solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Entregou todos os termos.

Recomendações:

Ver considerações finais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendeu a todas as pendências.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail cometica.saude@ufpr.br, necessário informar o CAAE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109098.pdf	18/05/2018 10:17:36		Aceito
Outros	carta_simples_pendencias_01.pdf	18/05/2018 10:14:13	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	termo_servicos_CroME.pdf	18/05/2018 10:12:51	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_correcao_01.docx	18/05/2018 10:11:30	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TALE_correcao_01.docx	18/05/2018 10:10:53	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	instrucoes_PB.pdf	18/05/2018 10:09:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_guarda_material_corrigido_01.pdf	18/05/2018 10:09:03	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_BJGS_02.docx	18/05/2018 10:07:44	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_anuencia.pdf	18/05/2018 10:06:54	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_concordancia_coparticipante.pdf	10/04/2018 14:52:25	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_BJGS_01.docx	09/04/2018 16:34:16	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	check_list_2.pdf	09/04/2018 16:33:46	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TALE_final.docx	09/04/2018 16:32:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_final.docx	09/04/2018 16:32:25	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_preenchida.pdf	09/04/2018 12:07:09	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_concordancia_dos_servicos_e	09/04/2018	BRUNO JOSE	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80 060-240

UF: PR Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

Outros	nvolvidos.pdf	12:03:50	GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Dispensa_do_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	09/04/2018 01:08:18	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidades_no_projeto.pdf	09/04/2018 00:58:21	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_guarda_de_material_biologico.pdf	09/04/2018 00:57:39	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_o_inicio_da_pesquisa.pdf	09/04/2018 00:56:52	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_eou_dados_coletados.pdf	09/04/2018 00:56:02	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Declaracao_de_tornar_publicos_os_resultados.pdf	09/04/2018 00:54:49	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	09/04/2018 00:53:29	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Analise_de_merito.pdf	09/04/2018 00:51:24	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Oficio_do_pesquisador_encaminhando_o_projeto_ao_CEPSD.pdf	09/04/2018 00:50:10	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Ata_de_aprovacao_do_projeto.pdf	09/04/2018 00:49:09	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 25 de Maio de 2018

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.675.187

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

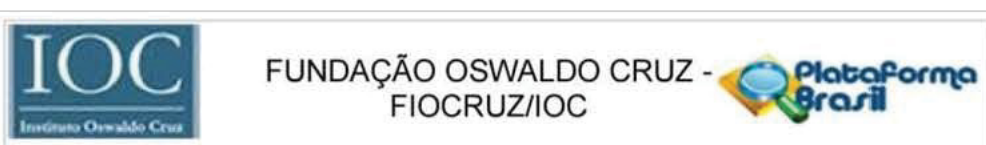
Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Técnica de Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca na Determinação de Fármacos em Amostras de Plasma por nanoLC-MS/MS

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87313218.7.3001.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.713.011

Apresentação do Projeto:

trata-se de um projeto de mestrado, que propõe o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para a determinação dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em amostras de plasma humano, empregando nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial como técnica analítica e microextração em fase líquida com fibra oca como preparo de amostra. Para realizar o desenvolvimento e

validação do método, serão necessárias amostras de plasma humano branco, ou seja, isentas dos analitos, estocadas e fornecidas pelo Laboratório Escola de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Neste mesmo local será realizada a coleta das amostras de plasma de voluntários em terapia dos fármacos selecionados, e estas serão utilizadas numa avaliação do desempenho do método proposto frente a amostras reais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Determinação dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima em amostras de plasma humano empregando microextração em fase líquida com fibra oca por nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

Objetivos Específicos

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.713.011

Desenvolver o método cromatográfico (nanoLC-MS/MS) para a determinação dos fármacos carbamazepina, diazepam, fluoxetina, haloperidol e trimetoprima;
Otimizar das condições de extração por microextração em fase líquida com fibra oca;
Avaliar os principais parâmetros de mérito do método desenvolvido em amostras de plasma humano;
Aplicar o método desenvolvido em amostras de plasma de pacientes em terapia com estes fármacos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os voluntários podem estar sujeitos a pequenos desconfortos durante o procedimento de coleta de sangue, como mal estar temporário, queda de pressão arterial, tontura e enjôo.

Benefícios:

O principal benefício deste projeto é o desenvolvimento de um protocolo analítico para determinação dos fármacos selecionados em plasma humano que, devido ao emprego de uma técnica de microextração, utiliza volumes reduzidos de solventes orgânicos, resultando em um menor impacto ambiental, e de amostra biológica. Adicionalmente, a microextração em fase líquida com fibra oca é uma técnica de baixo custo e simples. Após a validação, este protocolo poderá ser aplicado em estudos clínicos e farmacológicos, empregados visando estudos de toxicidade e monitoração terapêutica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está descrita de forma clara.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

Recomendações:

sem recomendações

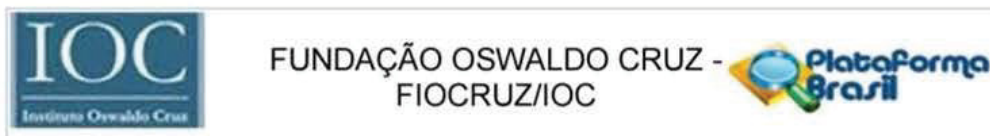
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo foi analisado anteriormente pelo CEP/SD da UFPR, o qual listou as pendências presentes naquele momento, as quais já foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 239ª Reunião Ordinária, realizada em 12.06.2018, de acordo com as atribuições definidas

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



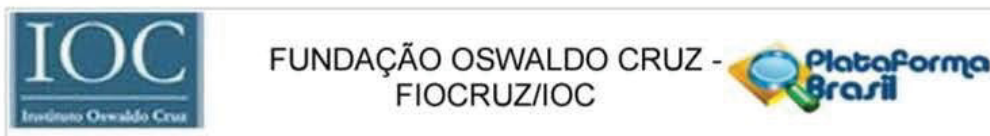
Continuação do Parecer: 2.713.011

na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	carta_simples_pendencias_01.pdf	18/05/2018 10:14:13	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	termo_servicos_CroME.pdf	18/05/2018 10:12:51	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_correcao_01.docx	18/05/2018 10:11:30	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TALE_correcao_01.docx	18/05/2018 10:10:53	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	instrucoes_PB.pdf	18/05/2018 10:09:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_guarda_material_corrigido_01.pdf	18/05/2018 10:09:03	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_BJGS_02.docx	18/05/2018 10:07:44	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_anuencia.pdf	18/05/2018 10:06:54	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_concordancia_coparticipante.pdf	10/04/2018 14:52:25	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_BJGS_01.docx	09/04/2018 16:34:16	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	check_list_2.pdf	09/04/2018 16:33:46	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TALE_final.docx	09/04/2018 16:32:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_final.docx	09/04/2018 16:32:25	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_concordancia_dos_servicos_e	09/04/2018	BRUNO JOSE	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.713.011

Outros	nvolveidos.pdf	12:03:50	GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Dispensa_do_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	09/04/2018 01:08:18	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidades_no_projeto.pdf	09/04/2018 00:58:21	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_guarda_de_material_biologico.pdf	09/04/2018 00:57:39	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_o_inicio_da_pesquisa.pdf	09/04/2018 00:56:52	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_eou_dados_coletados.pdf	09/04/2018 00:56:02	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Declaracao_de_tomar_publicos_os_resultados.pdf	09/04/2018 00:54:49	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	09/04/2018 00:53:29	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Analise_de_merito.pdf	09/04/2018 00:51:24	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Oficio_do_pesquisador_encaminhando_o_projeto_ao_CEPSPD.pdf	09/04/2018 00:50:10	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Ata_de_aprovacao_do_projeto.pdf	09/04/2018 00:49:09	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

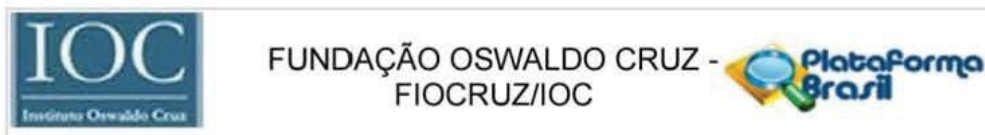
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Junho de 2018

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
 (Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.713.011

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br