UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Metodologia analítica para quantificação de omeprazol no pré e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica

Samuel Remotto Alves Ferreira

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Metodologia analítica para quantificação de omeprazol no pré e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Samuel Remotto Alves Ferreira
Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, S.R.A.

Metodologia analítica para quantificação de omeprazol no pré e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Ribeirão Preto, 2012.

66 p.:il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Queiroz, R.H.

1. Obesidade. 2. pacientes bariátricos. 3. omeprazol. 4. CLAE-UV.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Samuel Remotto Alves Ferreira

Metodologia analítica para quantificação de omeprazol no pré e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

*“Senhor Deus, eu te agradeço de todo coração...
Por causa do teu amor e da tua fidelidade, dou graças a ti.
Pois tens mostrado que o teu nome
e as tuas promessas estão acima de tudo.
Quando te chamei, tu me respondestes
e, com o teu poder, aumentaste as minhas forças...
O teu amor dura para sempre, ó Senhor Deus.
Não abandones o trabalho que começaste.”
(Salmo 138)*

“Algumas pessoas passam pelas nossas vidas e deixam marcas inesquecíveis. Enquanto umas nos apoiam com trabalho, outras nos apoiam com seu amor e carinho. Este tipo de ajuda é que nos fortalecem e nos dá força para vencermos cada batalha. Sabemos que apenas um simples obrigado não expressa a gratidão que sentimos, por isso, essas pessoas são guardadas em nossos corações e conosco permanecem por toda vida.”

Dedico este trabalho...

... a Deus, meu Pai eterno, bom guia e maior fonte de inspiração;

... à minha esposa e grande amor da minha vida, Isabel, pela sua cumplicidade, companheirismo durante estes anos e pelo seu amor, acima de tudo;

... ao meu pai Reneval e minha mãe Heloisa, meus amigos mais sinceros, por me tornarem o homem que sou e por serem co-autores desta vitória;

... às minhas irmãs, Josiene e Mariani, pelo carinho e por estarem comigo em cada jornada;

... à minha avó Mercedes e minha sobrinha Ana Luisa, fontes de amor e alegria;

... ao meu sogro e minha sogra, pelo incentivo e acolhimento durante estes anos.

A vocês meu eterno agradecimento pela presença e ajuda constante na caminhada da vida e na vitória desta minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Helena, minha orientadora, pela oportunidade, apoio, paciência, credibilidade e compreensão durante estes dois anos de curso,

À Sonia, uma pessoa muito especial, pela amizade, carinho e ensinamentos durante o trabalho,

Aos amigos adquiridos, e inesquecíveis, na pós-graduação, Flávia, Marina, Greyce, Luis Carlos, Mateus, Gilda, Cidinha, pelas horas divertidas durante os dias de pesquisa e pelo carinho dispensado nas horas difíceis,

Ao Dr. Wilson Salgado Junior e Dra. Camila Scalassara Campos pela oportunidade e confiança depositada,

Aos meus amigos, em especial Bruno Alves Rocha e Bruno Lemos Batista, pelo ânimo durante estes dois anos de trabalho e apoio nas horas difíceis,

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela dedicação ao trabalho e cuidado com todos nós,

À CAPES e a FAEPA pelo financiamento deste estudo.

RESUMO

Ferreira, S.R.A. **Metodologia analítica para quantificação de omeprazol no pré e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica**. 2012. 66p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A obesidade é uma doença crônica que atinge uma parcela preocupante da população mundial. É classificada pela OMS em graus I, II e III, de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC). A obesidade Grau III, ou obesidade mórbida, é um fator agravante para inúmeras doenças crônicas como as doenças gastro-esofágicas, diabetes mellitus e câncer. A cirurgia bariátrica é uma intervenção bastante eficaz quando se fala em obesidade grau III clinicamente severa. Porém, esta intervenção pode alterar a absorção e biodisponibilidade de fármacos como o inibidor da bomba de prótons, o omeprazol. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método analítico sensível e rápido utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de ultra-violeta (UV) para quantificação de omeprazol em plasma de pacientes submetidos a cirurgia bariátrica no pré e pós-operatório. A preparação da amostra foi feita por extração em fase sólida utilizando uma coluna SPE DSC-18Lt. Com coluna cromatográfica Nucleosil standard C18 phases 250 x 4 mm, 5 µm e fase móvel tampão fosfato 50 mM pH 7,0:acetonitrila:metanol (60,5:35:4,5 (v/v/v)). As amostras foram analisadas e os resultados expressos em ng/mL. O método foi validado quanto à sensibilidade, linearidade, seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de quantificação e robustez. A linearidade encontrada para o método foi de 5 a 1250 ng/mL. O limite de detecção estabelecido foi de 2 ng/mL e o de quantificação de 5 ng/mL. A metodologia apresentou valores de recuperação acima de 90%, exatidão e precisão interensaio variou de 96,5 a 98,1% e 5,4 a 7,0%, respectivamente. A precisão e exatidão intra-ensaio variou de 97,1 a 107,4%, respectivamente. A especificidade do método foi determinada para os seguintes interferentes: pantoprazol, metformina, fenformina, hidroclorotiazida, diazepam, lorazepam, oxazepam, clonazepam, ranitidina, propanolol, claritromicina e sulfametoxazol. A metodologia desenvolvida mostrou ser rápido e eficiente na correlação das concentrações plasmáticas do omeprazol administrado aos pacientes bariátricos, demonstrando uma porcentagem, estatisticamente significativa, na diminuição da absorção do fármaco no pós-operatório.

Palavras-chave: Obesidade, pacientes bariátricos, omeprazol, CLAE-UV

ABSTRACT

Ferreira, S.R.A. **Analytical methodology for quantification of omeprazole in pre and post-operative patients underwent bariatric surgery**. 2012. 66p. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Science of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Obesity is a chronic disease that affects an alarming proportion of the population. This disease is classified by the WHO in grades I, II and III, according to the Body Mass Index (BMI). Grade III obesity or morbid obesity, is an aggravating factor for innumerable chronic diseases such as gastro-esophageal diseases, diabetes mellitus and cancer. Bariatric surgery is a very effective intervention when it comes to clinically severe obesity class III. However, this intervention can alter the absorption and bioavailability of drugs such as the proton pump inhibitor omeprazole. The objective of this study was to develop a sensitive and rapid analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a ultra-violet detector (UV) for quantification of omeprazole in plasma of patients undergoing bariatric surgery before and after the procedure. Sample preparation was performed by solid phase extraction using a DSC-18Lt SPE column. Using a Nucleosil standard C18 phases 250 x 4 mm 5 μ m column, mobile phase phosphate buffer 50 mM pH 7.0:acetonitrile:methanol in the proportions of 60.5:35:4.5 (v/v/v), samples were analyzed and the results expressed in ng/ml. The method was validated for sensitivity, linearity, selectivity (specificity), accuracy, precision, quantification limit and robustness. The linearity of this method ranged between 5 and 1250 ng/mL. The detection limit was set at 2 ng/mL and the quantification limit at 5 ng/mL. The methodology presented recovery values above 90%. Inter-assay accuracy and precision ranged from 96.5 to 98.1% and from 5.4 to 7.0%, respectively, while intra-assay accuracy and precision varied from 97.1 to 107.4 and from 2.8 to 4.1%, respectively. The specificity of the method was determined for the following interferers: pantoprazole, metformin, phenformin, hydrochlorothiazide, diazepam, lorazepam, oxazepam, clonazepam, ranitidine, propranolol, clarithromycin and sulfamethoxazole. The developed methodology proved to be fast and effective in correlating the plasmatic concentrations of omeprazole administered to patients undergoing surgery, demonstrating statistically significant percentage in the drug absorption decrease after surgery.

Keywords: Obesity, bariatric patients, omeprazole, HPLC-UV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do omeprazol (Disponível em http://www.wikipedia.org/wiki/Omeprazol . Acessado em 02/02/2012)	6
Figura 2. Ilustração do mecanismo de regulação da secreção gástrica (Disponível em www.misodor.com/ESTOMAGO%20CIRURGICAL.html . Acessado em 02/02/2012)	7
Figura 3. Fórmula estrutural do lansoprazol (Disponível em www.wikipedia.org/wiki/Omeprazole . Acessado em 02/02/2012)	17
Figura 4. Procedimento de extração por SPE aplicado as amostras de plasma	19
Figura 5. Cromatogramas referentes à análise cromatográfica do Omeprazol.....	27
Figura 6. (A) Curva de calibração; (B) Linearidade de 5 a 1250 ng/mL referente ao método de análise de omeprazol em plasma de humanos	28
Figura 7. Coeficiente de correlação linear da curva de calibração do método de análise do omeprazol em plasma, com inclusão do ponto de concentração 5 ng/mL para o limite de quantificação	30
Figura 8. Parâmetros estatísticos baseado nos testes Wilcoxon considerando valores de significância ($p < 0,05$) para as amostras analisadas dos pacientes bariátricos onde foram correlacionados valores do pré e pós-operatório	32
Figura 9. Cromatogramas referentes à análise do plasma do paciente voluntário número 6	33
Figura 10. Mecanismo do procedimento de extração em fase sólida (SPE)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da obesidade através do IMC, segundo o Conselho Latino-Americano de Obesidade (Oliveira et al., 2004)	3
Tabela 2. Precisão e exatidão do método para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humano	29
Tabela 3. Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humano	29
Tabela 4. Precisão e exatidão do limite de quantificação para o omeprazol	30
Tabela 5. Precisão e exatidão do limite de detecção para o omeprazol	30
Tabela 6. Especificidade do método frente aos possíveis interferentes plasmáticos ..	31
Tabela 7. Dosagem de omeprazol em plasma de pacientes antes e após terem sido submetidos a cirurgia bariátrica	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Chromatography gás
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector ultra-violeta
CMD	Concentração média determinada
CT	Concentração teórica
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
HPLC	High performance liquid chromatography
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IMC	Índice de massa corpórea
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
ND	Não detectado
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de equilíbrio
SPE	Solid phase extraction
T _R	Tempo de retenção
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Obesidade e Intervenção Cirúrgica	2
1.2. Omeprazol	5
1.3. Metodologia Analítica	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivo Específico	11
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	13
3.1. Caracterização do Local de Estudo	13
3.2. Critério de Inclusão	13
3.3. Critério de Exclusão	13
3.4. Protocolo experimental para coleta de amostras	14
3.5. Método	15
3.6. Padronização do método analítico para determinação da concentração de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de ultra-violeta (CLAE-UV)	15
3.6.1. Padrões, reagentes e fármacos	15
3.6.1.1. Preparo dos reagentes e padrões	15
3.6.1.2. Solução tampão fosfato 25 mM pH 9,3	15
3.6.1.3. Soluções-Padrão	16
3.6.1.4. Solução de Padrão Interno: Lansoprazol	16
3.6.1.5. Instrumentação	16
3.6.1.6. Curva analítica	17
3.6.1.7. Método de extração em fase sólida para quantificação de omeprazol	17
3.6.1.8. Parâmetros utilizados na validação da metodologia	19
3.6.2. Curva de Calibração	19
3.6.2.1. Especificidade e seletividade	20
3.6.2.2. Linearidade	20

3.6.2.3. Limite de Detecção	20
3.6.2.4. Limite de Quantificação	21
3.6.2.5. Exatidão	21
3.6.2.6. Precisão	22
3.6.2.7. Recuperação	23
3.6.2.8. Estabilidade	23
4. RESULTADOS	25
4.1. Padronização e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	25
4.1.1. Cromatogramas referentes à metodologia analítica para a determinação e quantificação do omeprazol plasmático	25
4.1.2. Curva de calibração e curva de linearidade referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humano	26
4.1.3. Precisão e exatidão referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação do omeprazol plasmático	27
4.1.4. Recuperação referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma	27
4.1.5. Limite de quantificação referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma	28
4.1.6. Limite de detecção referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma	28
4.1.7. Estabilidade do método analítico para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma	29
4.1.8. Especificidade do método analítico para determinação e quantificação de omeprazol em plasma	29
4.2. Avaliação das dosagens de omeprazol em plasma de pacientes voluntários no pré e pós-operatório	29
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	49
Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	49
Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	50

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Intervenção Cirúrgica

A obesidade é uma doença universal, crônica, que vem alcançando proporções epidêmicas globais, sendo considerada um dos dez maiores riscos para a saúde (Santry et al., 2007).

A partir da década de 90, a obesidade passou a ser uma preocupação mundial. Desde então, sua prevalência vem aumentando de maneira alarmante em praticamente todos os países. São destacados como os fatores relacionados ao sobrepeso a diminuição da atividade física e o aumento no consumo de alimentos pobres em nutrientes e em fibras de alta densidade energética (Chenoweth; Leutzinger, 2006, Vedana et al., 2008).

De acordo com os dados da World Health Organization (WHO, 2006), 1,6 bilhão de pessoas com idade acima de 15 anos já apresentam sobrepeso, em 2015, as estimativas são de 2,3 bilhões de pessoas acima do peso e 700 milhões destas estarão obesas (Ravelli et al., 2007).

Estima-se que de 2 a 8% dos gastos com saúde no mundo sejam destinados ao tratamento da obesidade (Fandiño et al., 2004). Segundo dados da OMS, o aumento da incidência da obesidade está ocorrendo em ambos os sexos e independente da classe social e nível cultural (Pedrosa et al., 2009).

Estudos recentes nos Estados Unidos mostraram que a taxa de obesos dobrou na última década, enquanto que a taxa de obesidade grau III quadruplicou. No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o excesso de peso já acomete aproximadamente 40% da população adulta, sendo que 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres apresentam obesidade (Alves et al., 2006, Xanthakos et al., 2006, Ravelli et al., 2007, Rocha et al., 2009).

A maneira mais clara de avaliar a obesidade é através do Índice de Massa Corpórea (IMC). O IMC considerado normal compreende de 19 a 24,9 Kg/m², assim, pessoas com IMC de 25 a 29,9 são consideradas acima do peso (sobrepeso), enquanto aquelas entre 30 e 40 já são classificadas como obesas (Oliveira et al., 2004). Baseado no IMC, a OMS classifica a obesidade como de grau I, quando o

IMC se encontra entre 30,0 e 34,90 Kg/m², obesidade de grau II, quando IMC entre 35,0 a 39,9 Kg/m² e obesidade de grau III, quando o IMC se encontra acima de 40,0 Kg/m².

Tabela 1. Classificação da obesidade através do IMC, segundo o Conselho Latino-Americano de Obesidade (Oliveira et al., 2004).

Classificação da Obesidade	IMC (Kg/m²)	Risco de Comorbidades
Baixo peso	até 18,9	Baixo
Normal	de 19,0 a 24,9	Médio
Sobrepeso	de 25,0 a 29,9	Aumentado
Obesidade grau I	de 30,0 a 34,9	Moderado
Obesidade grau II	de 35,0 a 39,9	Severo
Obesidade grau III	acima de 40,0	Muito severo

IMC - Índice de Massa Corporal

Os dados apresentados na Tabela 1 foram calculadas de acordo com as estatísticas que relacionam o trinômio: qualidade de vida, obesidade e riscos à saúde. Estes cálculos foram realizados em milhares de voluntários nos Estados Unidos, portanto alguns grupos étnicos isolados podem requerer valores especiais de IMC (Macdonald, 2000).

Outra variável que está sendo recomendada para avaliação da obesidade intra-abdominal (visceral) está relacionada à circunferência abdominal, considerada, segundo a OMS, a metade da distância entre a última costela e a crista ilíaca em posição de inspiração. Do ponto de vista quantitativo, valores superiores a 98 e 88 cm para homens e mulheres, respectivamente, podem aumentar as chances do aparecimento de comorbidades relacionadas à obesidade (Macdonald, 2000, Gokcel et al., 2002).

Todavia, pessoas que apresentam obesidade grau III recebem a classificação de obesos mórbidos (Center for disease control and prevention, 2006). Pacientes que apresentam obesidade grau III são frequentemente portadores de doenças que ameaçam a vida, reduz a qualidade de vida e a auto-estima (Oliveira et al., 2004). O tratamento desta obesidade deve compreender diversos tipos de abordagem, sendo que a orientação dietética, a programação da atividade física e o uso de

medicamentos são os pilares principais da terapia (Segal; Fandiño, 2002). Contudo, mesmo com grande empenho uma boa parcela dos pacientes com obesidade grau III retoma o peso inicial em pouco tempo, necessitando assim, de uma intervenção mais eficaz (Valezia et al., 2008).

Com o histórico de obesidade de grau III e apresentando um quadro de insucesso no tratamento por métodos convencionais, a intervenção cirúrgica vem se popularizando como forma de tratamento mais eficaz (Carvalho et al., 2007).

Pacientes com obesidade grau III e, que não respondem ao tratamento convencional, podem ser abordados cirurgicamente, permitindo assim, melhores condições de acompanhamento e controle dos parâmetros de saúde a longo prazo (Pareja et al., 2005, Bal et al., 2010).

O tratamento cirúrgico de pacientes com obesidade grau III é indicado quando há ineficácia do tratamento não cirúrgico e quando há um elevado risco de obesidade clinicamente severa. Nestes casos, a cirurgia bariátrica tem-se mostrado bem eficaz e segura quando se fala em longevidade e a qualidade de vida dos obesos mórbidos (Ferraz et al., 2003).

A indicação para esse tipo de tratamento deve se basear em uma análise dos múltiplos aspectos clínicos do paciente. O mesmo deve ser assistido antes e após a cirurgia bariátrica por uma equipe multidisciplinar composta por endocrinologistas, nutricionistas, cardiologistas, pneumologistas, psiquiatras, psicólogos e cirurgiões (Fandiño, 2004).

A cirurgia bariátrica pode ser de vários tipos: restritiva (banda gástrica), disabsortiva (derivação biliopancreática) ou restritivo-disabsortiva (bypass gástrico em Y de Roux) (Alves et al., 2006), sendo a última uma intervenção que produz restrição alimentar e má absorção relativa, considerada hoje a cirurgia mais eficaz amplamente utilizada nos Estados Unidos, país que realiza o maior número de cirurgias bariátricas no mundo (Pareja et al., 2005).

Pacientes que realizaram o *Bypass* gástrico, cirurgia em que ocorre a inativação de uma porção do intestino delgado, apresentaram uma redução considerável na produção de ácido clorídrico. Desta maneira, a redução drástica da superfície intestinal pode levar ao comprometimento da absorção de medicamentos, que pode ser ainda maior quando se trata de medicamentos dependentes de um ambiente ácido para se solubilizar (Magee et al., 2007).

Embora haja estudo demonstrando que a cirurgia bariátrica é um processo que leva a uma possível deficiência nutricional (Bregion et al., 2007), poucas pesquisas têm-se dedicado ao real efeito da cirurgia bariátrica sobre a absorção de fármacos (Fugioka, 2005).

A redução na absorção de fármacos após o processo cirúrgico é uma preocupação em potencial, uma vez que em certas cirurgias a porção inicial do intestino delgado é inativada, local em que a maioria dos fármacos orais são absorvidos. De outra maneira, as cirurgias restritivas utilizam-se de um método que provoca um retardamento no esvaziamento gástrico, o que prejudica bastante a exposição do fármaco à mucosa intestinal, diminuindo o processo de absorção. Além disso, alteração no pH intestinal pode alterar a dissolução de fármacos, o que dificulta o processo absorptivo. Assim, uma compreensão destas variabilidades de absorção é fundamental para garantir um ajuste de dosagem adequado, levando uma maximização dos efeitos terapêuticos do fármaco (Miller; Kelly, 2006).

A cirurgia bariátrica é uma intervenção bastante eficaz em alguns casos de obesidade, porém, este processo cirúrgico, como já descrito anteriormente, representa uma perda considerável na superfície de absorção, alterando assim, a biodisponibilidade de fármacos. Padwal et al. (2009) relata uma considerável diminuição na absorção de fármacos como a ciclosporina, tiroxina, fenitoína, rifampicina, entre outros, quando os pacientes são submetidos à cirurgia bariátrica. Esta perda pode justificar a adequação da posologia para estes medicamentos, garantindo uma concentração plasmática mais adequada ao tratamento. Desta forma, como o omeprazol é um medicamento bastante utilizado em pacientes obesos, este estudo investigou a possibilidade de alteração na biodisponibilidade deste fármaco.

1.2 Omeprazol

Omeprazol, um substituído benzimidazólico, é o primeiro dos inibidores da bomba de prótons amplamente utilizado na profilaxia e no tratamento de úlceras gastro-duodenal, no tratamento de refluxo gastro-esofágico sintomático e em infecções por *Helicobacter pylori*, associado com claritromicina ou amoxicilina (Shimizu et al., 2006, Bosch et al., 2007).

Figura 1. Fórmula estrutural do omeprazol (Disponível em <http://www.wikipedia.org/wiki/Omeprazol>. Acessado em 02/02/2012).

Omeprazol é uma base fraca inibidora gástrica da bomba de prótons (H^+/K^+ ATPase) (Cheng et al., 2002, Nevado et al., 2005). Ele apresenta pK_{a1} de 4,2 e pK_{a2} de 9,0 (Bosch et al., 2007), portanto, sofre rápida difusão através das membranas lipídicas para os compartimento acidificados (como é o caso dos canalículos das células parietais). No interior destes canalículos ele é protonado e concentrado, transformando-se no cátion sulfonamida tiofílico reativo e ativo. Esta sulfonamida consegue formar ligação dissulfeto covalente com a enzima, inativando irreversivelmente a bomba de prótons (Bharathi et al., 2009).

A absorção do omeprazol ocorre no intestino delgado e é, geralmente, completada em $1,5 \pm 0,5$ hora e seu efeito persiste por 24 horas. A alimentação interfere no processo de absorção deste fármaco, por isso, sua posologia é recomendada 1 hora antes das refeições. Quanto a metabolização, é exclusivamente hepática, sendo seus metabólitos inativos quanto a inibição da produção de ácido clorídrico (Bosch et al., 2007).

A bomba de prótons é responsável pela secreção ácida gástrica. Os prótons (H^+) para a formação do ácido são gerados nos canalículos intracelulares pela ação da enzima anidrase carbônica. O íon cloreto (Cl^-) é transportado ativamente para dentro dos canalículos que se comunicam com a luz das glândulas gástricas e conseqüentemente com a luz do estômago. O potássio acompanha o Cl^- , sendo trocado pelo H^+ intracelular, com gasto energético fornecido pela catalisação do ATP. O bicarbonato formado a partir do CO_2 e H_2O pela anidrase carbônica dissocia-se para formar H^+ e HCO_3^- , o qual é trocado por Cl^- na membrana apical. Nas células parietais em repouso, a bomba de H^+ / K^+ ATPase é armazenada em tubulovesículas citoplasmáticas. Quando os receptores das células parietais são estimulados por

seus agonistas, são gerados segundos mensageiros, que através da cascata de fosforilação fazem com que as tubulovesículas contendo a bomba de $H^+ / K^+ ATPase$ se fundam com a membrana apical, permitindo que a enzima transmembrânica se torne ativa. Na ausência do estímulo as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático (Schubert; Peura, 2005, Guyton; Hall, 2011).

A ativação desses receptores estimula a liberação de ácido gástrico nos canalículos secretores da célula parietal. Com a diminuição do pH gástrico, somatostatina antral D é liberada a partir das células locais, diminuindo a liberação de gastrina. Além disso, a acidificação do duodeno provoca liberação de secretina, que também age na inibição da secreção gástrica (Aihara et al., 2003).

A secreção gástrica está sob forte influência do sistema nervoso central e hormonal. Este processo fisiológico é controlado pela ligação da gastrina, acetilcolina, histamina e prostaglandinas aos receptores específicos na superfície das células parietais. O efeito estimulante da acetilcolina e gastrina na liberação de ácido gástrico é mediada pelo aumento do cálcio citosólico, enquanto que o efeito da histamina é mediado pela ativação da guanilato ciclase e geração de AMP cíclico (cAMP) (Savarino et al., 2009).

Figura 2. Ilustração do mecanismo de regulação da secreção gástrica (Disponível em <http://www.misodor.com/ESTOMAGO%20CIRURGICAL.html>. Acessado em 02/02/2012)

A gastrite é uma inflamação que acomete o estômago, podendo ser de origem endógena ou exógena, variando de comprometimento superficial discreto à atrofia grave da mucosa. Esta patologia pode provocar erosão da mucosa que, se estendida a planos mais profundos, são denominadas úlceras (Scalon, Fernandes, 2010).

A causa destas doenças provêm de diferentes mecanismos patogênicos e, independente de sua etiologia, são formadas quando ocorre um desequilíbrio entre fatores agressores da mucosa, sejam eles endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (etanol, anti-inflamatórios não estereoidais, tabagismo), e os fatores protetores da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico). Este desequilíbrio pode ocorrer devido a redução dos mecanismos de defesa, aumento dos fatores agressores ou a associação de ambos (Brasileiro-Filho, 2009).

Dentre os fatores etiológicos está o estresse, o qual parece desencadear a doença devido a uma isquemia da mucosa gástrica; o consumo de álcool, que leva à inflamação do estômago pelas alterações vasculares precoces da mucosa gástrica como estase capilar, dilatação, lesão endotelial e hemorragia subepitelial; medicamentos como antiinflamatórios não-esteroidais e aspirina, que contribuem causando dano direto à estrutura da mucosa, queda na fabricação de bicarbonato e na síntese de prostaglandinas, que é essencial à integridade da mucosa; refluxo biliar comum em casos de ressecção gástrica e de vagotomia troncular com piloroplastia; e agentes infecciosos como o *Helicobacter pylori* (Vilella et al., 2004).

A obesidade mórbida é um forte fator de risco para o surgimento deste tipo de doenças (Buchwald et al., 2004). Inúmeros tratamentos são empregados na cura destas patologias, dentre esses destaca-se o inibidor da bomba de prótons, omeprazol.

1.3 Metodologia Analítica

Métodos cromatográficos já foram descritos para a determinação de omeprazol em fluidos biológicos, destes métodos muitos são baseados no uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra-violeta (CLAE-UV) (Yuen et al., 2001, Orlando; Bonato, 2003, Rambla-Alegre et al., 2008).

Alguns autores utilizaram a extração líquido-líquido obtendo boa sensibilidade para a quantificação de omeprazol. Resk et al.(2006), com uma coluna C18 Zorbax® (150 mm x 3.0 mm) e fase móvel composta por tampão fosfato e metanol, conseguiu um tempo de retenção para o omeprazol de 8 minutos para uma recuperação de 84%.

Em alguns trabalhos autores substituíram o processo de extração líquido-líquido por precipitação protéica como princípio de eliminação de interferentes para extração de fármacos. Nestes métodos as proteínas plasmáticas são precipitadas com acetonitrila e o sobrenadante removido, seco, reconstituído em fase móvel e injetado no sistema (Jia et al., 2006, Macek et al., 2007, Ha et al., 2010).

A otimização do método por CLAE-UV baseia-se no processo de purificação e na escolha da coluna utilizada, que visam uma melhor quantificação e determinação do fármaco. A extração e purificação do fármaco em fluidos biológicos é o passo inicial e mais difícil na análise do material biológico devido à necessidade de remover seletivamente interferentes sem perda significativa do analito (Amini et al., 2005).

Processos de purificação de amostras biológicas que utilizam extração líquido-líquido são comumente utilizados para retirada de interferentes. Porém, hoje já é sabido que o impacto ambiental que estes métodos causam é assustador. Assim, a tentativa de um método onde se consiga a máxima recuperação do analito com o mínimo de gasto de reagentes é fundamental para que se alcance a máxima eficiência analítica.

Os pré-requisitos para se realizar a monitorização das concentrações plasmáticas são os conhecimentos dos parâmetros farmacocinéticos do fármaco e a disponibilidade de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade para quantificar as baixas concentrações plasmáticas dos fármacos. Assim, a escolha da cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta foi proposta considerando-se a alta disponibilidade deste aparelho na clínica aliado à sua versatilidade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de omeprazol em plasma de pacientes que foram submetidos a cirurgia bariátrica para que se possa fazer uma comparação entre as concentrações plasmáticas no pré e pós-operatório.

2.2 Objetivo Específico

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação de omeprazol em plasma humano utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detecção por ultra-violeta (CLAE-UV).
- Aplicar a metodologia desenvolvida e validada em amostras de plasma de pacientes que foram submetidos a cirurgia bariátrica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e comparar as mesmas para verificar se houve alterações de concentração de omeprazol no pré e no pós-operatório.

CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Caracterização do Local de Estudo

O projeto foi realizado na Universidade de São Paulo, através da colaboração multidisciplinar entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e o Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo *campus* Ribeirão Preto (Anexo 1).

3.2 Critério de Inclusão

Os pacientes foram recrutados no Departamento de Cirurgia e Anatomia do HCFMRP-USP pelo médico responsável Dr. Wilson Salgado Junior atendendo aos seguintes critérios: a) ter idade igual ou superior a 18 anos, b) submeter-se à cirurgia bariátrica, c) apresentar quadros de doenças gastro-esofágicas e d) fazer uso de omeprazol.

Os pacientes foram convidados a participar do estudo durante uma consulta prévia à realização da cirurgia e foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa. Após aceitação, cada paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) sabendo que poderiam optar por deixar de participar do estudo a qualquer momento.

3.3 Critério de Exclusão

Pacientes que fazem uso de lansoprazol, pois este fármaco foi utilizado como padrão interno para a determinação do omeprazol.

3.4 Protocolo Experimental para Coleta de Amostras

Foram realizadas coletas de sangue em pacientes submetidos a cirurgia bariátrica pelo período de dois meses a partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

As cirurgias foram realizadas pelo cirurgião Dr. Wilson Salgado Junior e sua equipe do Departamento de Cirurgia e Anatomia do HCFMRP-USP. Neste estudo dispensou-se o uso de grupo controle, pois a amostra de cada paciente no pré-operatório foi utilizada como controle das amostras do pós-operatório, ou seja, cada paciente foi controle de si mesmo. Assim, um (1) mês antes da realização da cirurgia foram colhidas duas amostra de sangue do paciente em estudo, uma (1) amostra antes da administração do omeprazol e uma (1) amostra uma hora e meia (1,5 h) após ter tomado a medicação em questão. Esta primeira etapa foi utilizada como controle para a etapa posterior.

Um (1) mês após a realização da cirurgia o procedimento descrito anteriormente se repetiu, deste modo, foi possível comparar as doses no pré e pós-operatório após ter tomado o medicamento, avaliando se houve alteração nas suas concentrações devido ao processo cirúrgico. A colheita feita antes de tomar a medicação, tanto para o período pré-operatório como para o período pós-operatório, foi necessária para avaliar se existe omeprazol residual que possa sobrepor aos valores da próxima administração, assim, se houver, estes valores podem ser subtraídos.

É importante salientar que todo o procedimento de administração do medicamento foi realizado sob monitorização do cirurgião e supervisão direta da equipe de enfermagem, garantindo que o paciente realmente tenha feito uso do medicamento e que o tempo de coleta fosse padronizado.

Como observado, as colheitas de sangue foram realizadas um (1) mês antes do paciente ser submetido a cirurgia e um (1) mês após ter sido submetido ao mesmo processo. Este protocolo é fundamental para que seja evitado que o estresse decorrente da intervenção cirúrgica ou até mesmo, a diferença na alimentação, pudesse interferir na biodisponibilidade do medicamento. Para a colheita feita após a cirurgia, foi necessário o tempo de um (1) mês para que se garantisse que o medicamento atingisse novamente o equilíbrio de seis (6) meias-

vidas que se encontrava antes da cirurgia, pois durante a cirurgia e um curto período após a mesma, o paciente deixou de tomar a medicação.

As amostras foram coletadas em tubos de 4,0 mL, sob vácuo, contendo heparina de lítio, permanecendo por no máximo 15 minutos fora da geladeira após a colheita. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 3000 g por quinze minutos e enviadas ao laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo *campus* Ribeirão Preto. No laboratório as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de ultra-violeta.

3.5 Método

3.5.1 Padronização do método analítico para determinação da concentração de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de ultra-violeta (CLAE-UV).

3.5.1.1 Padrões, reagentes e fármacos

O padrão interno lansoprazol e o padrão de omeprazol foram obtidos da empresa Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA). Os solventes metanol e acetonitrila adquiridos da J.T. Baker[®] (Phillipsburg, EUA), tampão fosfato da Divisão Q.M. Reagentes/Merck[®] (Brasil). Sendo todos os solventes utilizados grau HPLC.

3.5.1.2 Preparo dos reagentes e padrões

3.5.1.2.1 Solução tampão fosfato 25 mM pH 9,3

O tampão fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 25 mM pH 9,3 foi feito pela adição de 3,4 g de KH_2PO_4 em 990 mL de água deionizada. O pH final da solução foi ajustado para 9,3 com hidróxido de potássio e o volume final completado para 1000 mL com água deionizada. A solução final foi filtrada através de membrana filtrante (0,45 μm) Millipore[®] sob vácuo.

3.5.1.2.2 Soluções-padrão

A solução estoque de omeprazol na concentração de 1,0 mg/mL foi preparada dissolvendo-se 5 mg do pó de omeprazol em 5 mL de metanol e, a partir desta solução, foram preparadas soluções diluídas nas concentrações de 25; 16; 10; 4; 2; 1,6; 0,8 e 0,4 µg/mL de metanol, o que corresponderam a concentrações finais no plasma de 625, 400, 250, 100, 50, 40, 20 e 10 ng/mL, respectivamente. Após esta etapa, as soluções foram estocadas a -20°C em tubos de vidro, protegidos da luz.

3.5.1.2.3 Solução de padrão interno: lansoprazol

O lansoprazol (Figura 3) foi escolhido como padrão interno, por apresentar estrutura química semelhante ao omeprazol. A solução estoque preparada foi de 1,0 mg/mL metanol, onde dissolveu-se 5 mg do pó de lansoprazol em 5 mL de metanol e, a partir desta, preparou-se uma solução de trabalho na concentração de 8 µg/mL de metanol, que corresponde a uma concentração final no plasma de 200 ng/mL. As soluções também foram estocadas a -20°C em tubos de vidro, protegidos da luz.

Figura 3. Fórmula estrutural do lansoprazol (Disponível em <http://www.wikipedia.org/wiki/Omeprazole>. Acessado em 02/02/2012).

3.5.1.3 Instrumentação

A determinação dos níveis plasmáticos do omeprazol foi realizada pela injeção de 20 µL da amostra em um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE) Shimadzu HPLC modelo LC - 10AT equipado com detector UV Visível modelo SPD 20A com comprimento de onda (λ) fixado em 294 nm e na utilização da coluna de separação cromatográfica Nucleosil standard C18 phases 250 x 4 mm, 5 μ m da empresa Macherey - Nagel® (Düren, Germany) com pré-coluna uma Nucleosil 100 - 5 C18, Macherey - Angel (Düren, Germany).

3.5.1.4 Curva analítica

Alíquotas de 500 μ L de plasma à temperatura ambiente foram adicionadas de 12,5 μ L das soluções de omeprazol (25; 16; 10; 4; 2; 1,6; 0,8; 0,4 μ g/mL de metanol) e 12,5 μ L de lansoprazol (16 μ g/mL de metanol) e submetidas ao processo de extração e análise cromatográfica. A partir desta análise construiu-se a curva analítica, a qual foi utilizada para o cálculo das amostras analisadas.

3.5.1.5 Método de extração em fase sólida para quantificação de omeprazol

A técnica de escolha para a etapa de preparação da amostra foi a extração em fase sólida (SPE), por ser uma excelente alternativa na solução de problemas relacionados aos processos extratores. Para tal técnica utilizou-se uma coluna de extração em fase sólida (SPE) DSC-18Lt (C18). Alíquotas de 500 μ L de plasma a temperatura ambiente foram adicionadas de 12,5 μ L das diferentes concentrações de padrão de omeprazol, objetivando o preparo da curva analítica para estudos dos parâmetros de validação, e 12,5 μ L de padrão interno. Posteriormente as amostras foram submetidas ao processo descrito na figura 4.

Figura 4. Procedimento de extração por SPE aplicado as amostras de plasma

3.5.1.6 Parâmetros utilizados na validação da metodologia

A validação de métodos analíticos constitui um procedimento fundamental para verificar se o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido e para garantir a confiabilidade dos dados produzidos. Os parâmetros analisados durante o processo de validação desta metodologia foram os preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução nº 899 de 29 de Maio de 2003 para métodos bioanalíticos. Assim, os parâmetros bioanalíticos específicos foram determinados com respeito à curva de calibração, linearidade, precisão intra e interensaios, exatidão, recuperação, limite de quantificação, especificidade/seletividade e estabilidade (ANVISA, 2003, INMETRO, 2003a).

3.5.1.6.1 Curva de calibração

A curva de calibração define adequadamente a relação existente entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. Para construirmos uma curva de calibração é necessária a análise cromatográfica de, pelo menos, 6 amostras submetidas ao método de extração proposto. As concentrações dos padrões devem ser escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo realizado. Em seguida, são calculadas as equações de regressão linear ($y = ax + b$) e o coeficiente de correlação (r^2). Coeficiente de correlação igual a 1 indica correlação perfeita entre x e y, enquanto coeficiente igual a 0 indica não haver correlação entre os valores (Chasin et al., 1998).

Para a construção das curvas de calibração do omeprazol, 12,5 µL de cada uma das soluções padrão descritas no item 3.5.1.2.2 e 3.5.1.2.3 foram submetidas aos procedimentos de extração (Figura 4) e análise cromatográfica descrito no item 3.5.1.3.

A regressão linear foi obtida plotando-se as oito concentrações plasmáticas no eixo das abscissas (X) e a relação da altura dos picos do padrão de omeprazol pelo padrão interno no eixo das ordenadas (Y).

3.5.1.6.2 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui em medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra, impurezas, produtos de decomposição e metabólitos. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles. Neste estudo foram analisadas as especificidade do método para os seguintes medicamentos: pantoprazol, metformina, fenformina, hidroclorotiazida, diazepam, lorazepam, oxazepam, clonazepam, ranitidina, propranolol, claritromicina e sulfametoxazol.

3.5.1.6.3 Linearidade

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação de primeira ordem, ou seja, linear, é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) da substância nas amostras, podendo ser descrita pela equação de regressão linear: $y = ax + b$, onde 'a' é a inclinação da reta e 'b' é a intersecção da curva no eixo y (Peng; Chiou, 1990). A linearidade correspondente a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada dentro de uma determinada faixa (Swartz; Krull, 1998).

Segundo as normas do Center for Drug Evaluation and Research (UNITED STATES, 1998) aceitam-se valores de coeficiente de correlação linear (r) superiores a 0,95, contudo em nossos ensaios foram consideradas lineares curvas com r superior a 0,98 (Chasin et al., 1998).

3.5.1.6.4 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para métodos instrumentais (CLAE e CG), a

estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

Os ensaios foram realizados em duplicatas, fortificando-se as amostras de plasma com concentrações decrescente de omeprazol até que os cromatogramas do composto analisado apresentaram valores iguais ou superiores a 3 vezes o ruído da linha de base.

3.5.1.6.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade (Swartz; Krull, 1998). Para o LQ ser aceito, ele deve apresentar precisão e exatidão de até 20%, e deve ser pelo menos cinco vezes maior que o sinal e ruído da linha de base da amostra branca.

Para determinar essa concentração, foi construída uma curva de calibração para o omeprazol, como descrito no item 3.5.1.4, e o limite de quantificação foi considerado a menor concentração que forneceu precisão e exatidão com erro inferior à 20%, segundo definição de Pommier et al., (1997).

3.5.1.6.6 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Quando a avaliação é realizada com a média de uma série de resultados, envolvendo a variação destes dados, obtém-se a veracidade de um método, o que é normalmente determinado durante a validação (Eurachem, 2000, INMETRO, 2003a).

A exatidão é verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada. Os valores de exatidão aceitos podem sofrer variações iguais ou inferiores a 15%. Ela pode ser calculada pela equação matemática representada abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

No qual:

CME: Concentração Média Experimental

CT: Concentração Teórica

3.5.1.6.7 Precisão

A precisão é uma medida da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes em condições definidas. Dependendo das condições definidas durante a validação, a precisão pode ser expressa como repetitividade ou reprodutibilidade (Eurachem, 2000, INMETRO, 2003a).

A precisão é expressa através do desvio padrão, ou desvio padrão relativo, dos resultados obtidos, onde o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%. A precisão, como a exatidão, depende da concentração do analito e, portanto, deve ser determinada em diferentes níveis de concentração (Eurachem, 2000, INMETRO, 2003a).

Na precisão intra-ensaio foram analisadas dez alíquotas ($n = 10$) de uma mesma amostra dentro de um dia, para cada concentração (baixa, média e alta). Na precisão interensaio, foram considerados os resultados das análises de cinco alíquotas diferentes realizadas em cinco dias consecutivos ($n = 5$), em duplicada para cada concentração (baixa, média e alta). As concentrações do fármaco nas amostras foram determinadas empregando-se curvas de calibração preparadas diariamente (INMETRO, 2003a).

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

No qual:

DPR: Desvio Padrão Relativo

DP: Desvio Padrão

CMD: Concentração Média Determinada

3.5.1.6.8 Recuperação

A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações altas, medias e baixas, com outras não extraídas (curva seca) representando 100% de recuperação.

Embora recuperações próximas a 100% sejam desejáveis, a extensão da recuperação de um analito pode ser aceita até na ordem de 50 – 60%, se a recuperação for precisa, exata e reprodutível.

Para a metodologia apresentada, foi avaliado a recuperação absoluta para a substância. A recuperação do omeprazol foi obtida através da construção de uma curva não extraída (curva seca) com oito concentrações (10; 20; 40; 50; 100; 250, 400 e 625 ng/mL) e uma curva extraída, como descrito no item 3.5.1.4, também com oito concentrações, ambas em duplicatas.

3.5.1.6.9 Estabilidade

A estabilidade de fármacos em fluídos biológicos depende da propriedade química do fármaco, da matriz biológica e das condições de acondicionamento utilizadas (INMETRO, 2003a). As determinações de estabilidade devem utilizar amostras preparadas a partir de uma solução estoque recente da substância em análise, adicionada a uma matriz biológica isenta de interferência (INMETRO, 2003a).

Para os estudos de estabilidade, brancos de plasma foram adicionados de soluções padrão para obtenção de amostras em quatro diferentes concentrações de omeprazol (100, 250, 400 e 625 ng/mL).

Alíquotas de 500µL de plasma enriquecido com omeprazol foram armazenadas a -20°C até a análise. As alíquotas foram analisadas durante sete dias consecutivos, a cada quinzena, a cada mês, durante quatro meses consecutivos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Padronização e validação do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV).

4.1.1. Cromatogramas referentes à metodologia analítica para a determinação e quantificação do omeprazol plasmático

Figura 5. Cromatogramas referentes à análise cromatográfica do Omeprazol.

- A) Plasma Branco adicionado com padrão interno (200 ng/mL) (T_R = tempo de retenção em minutos / T_R = 8,968 min.);
- B) Plasma humano adicionado com o padrão de omeprazol (400 ng/mL) e padrão interno (200 ng/mL) (T_R = tempo de retenção em minutos / T_R = 6,343 min. para omeprazol e T_R = 9,046 min. para padrão interno lansoprazol).

4.1.2. Curva de calibração e curva de linearidade referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humano

Figura 6. (A) Curva de calibração; (B) Linearidade de 5 a 1250 ng/mL referente ao método de análise de omeprazol em plasma de humanos.

4.1.3. Precisão e exatidão referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação do omeprazol plasmático

Tabela 2. Precisão e exatidão do método para a determinação e quantificação do omeprazol em plasma humano

Concentração Real	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão (CV, %)	Exatidão (%)
INTRA – ENSAIO (n = 10)			
20 ng.mL ⁻¹	20,73	3,1	101,4
100 ng.mL ⁻¹	107,43	4,1	107,4
600 ng.mL ⁻¹	588,56	2,8	97,1
INTERENSAIO (n = 5)			
20 ng.mL ⁻¹	21,72	5,4	96,5
100 ng.mL ⁻¹	99,46	7,0	99,4
600 ng.mL ⁻¹	592,56	6,2	98,1

CV = coeficiente de variação

4.1.4. Recuperação referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma

Tabela 3. Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humano.

Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)
10	106,0
20	98,6
40	92,4
50	94,6
100	96,7
250	94,9
400	90,2
625	91,1

4.1.5. Limite de quantificação referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma

Tabela 4. Precisão e exatidão do limite de quantificação para o omeprazol

Concentração plasmática (ng/mL)	Valor obtido (ng/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
5,0	5,76	5,0	115,2

CV = coeficiente de variação

Figura 7. Coeficiente de correlação linear da curva de calibração do método de análise do omeprazol em plasma, com inclusão do ponto de concentração 5 ng/mL para o limite de quantificação.

4.1.6. Limite de detecção referente à metodologia analítica para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma

Tabela 5. Precisão e exatidão do limite de detecção para o omeprazol

Concentração plasmática (ng/mL)	Valor obtido (ng/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
2	4,83	9,6	242,5

CV = coeficiente de variação

4.1.7. Estabilidade do método analítico para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma.

Através dos testes de estabilidade do omeprazol e padrão interno, como descrito no item 3.5.1.6.9, foi possível evidenciar que a estabilidade para as soluções conservadas a -20°C foi de quatro (4) meses.

4.1.8. Especificidade do método analítico para determinação e quantificação de omeprazol em plasma.

Tabela 6. Especificidade do método frente a possíveis interferentes plasmáticos

Fármaco	Concentração (ng/mL)	T_R (min)
Pantoprazol	600	ND
Metformina	2500	ND
Fenformina	1000	ND
Hidroclorotiazida	2500	ND
Diazepam	1000	ND
Lorazepam	2500	ND
Oxazepam	2000	ND
Clonazepam	2500	ND
Ranitidina	1000	ND
Propanolol	1000	ND
Sulfametoxazol	500	ND
Claritromicina	800	ND

ND = não detectado em tempo próximo a seis (6) e nove (9) minutos; T_R = tempo de retenção

4.2 Avaliação das dosagens de omeprazol em plasma de pacientes voluntários no pré e pós-operatório.

Os dados referentes as dosagens de omeprazol no plasma dos seis (6) pacientes submetidos a cirurgia bariátrica estão demonstrados na tabela 6. Os cromatogramas expressos na figura 9 representam as dosagens do paciente de

número 6, onde o cromatograma A representa a colheita realizada um (1) mês antes ao procedimento cirúrgico e uma hora e meia (1,5h) após o paciente ter tomado 60 mg de omeprazol e, o cromatograma B representa a colheita realizada um (1) mês após o processo cirúrgico e uma hora e meia (1,5h) após o paciente ter tomado 60 mg da medicação em questão.

Na figura 8 está representado o teste de Wilcoxon para se determinar o nível de significância ($p < 0,05$) para as amostras analisadas. Neste estudo foi possível evidenciar que as diferenças de concentrações para o pré e pós-operatório se mostraram significantes, com valor próximo a 0,03.

Tabela 7. Dosagens de omeprazol em plasma de pacientes antes e após terem sido submetidos a cirurgia bariátrica.

Pacientes	Pré-operatório (Concentração omeprazol)	Pós-operatório (Concentração omeprazol)
1	388.66	233.49
2	347.72	159.73
3	292.80	224.89
4	430.92	308.01
5	585.70	460.51
6	485,50	341,29

Figura 8. Parâmetros estatísticos baseado nos testes Wilcoxon considerando valores de significância ($p < 0,05$) para as amostras analisadas dos pacientes bariátricos onde foram correlacionados valores do pré e pós-operatório.

Figura 9. Cromatogramas referentes à análise do plasma do paciente voluntário número 6.

- A) Plasma adicionado com padrão interno um (1) mês antes do paciente ser submetido a cirurgia bariátrica e uma hora e meia (1,5) após ter tomado 60 mg de omeprazol, representando uma concentração de omeprazol de 485,50 ng/mL.
- B) Plasma adicionado com padrão interno um (1) mês após o paciente ser submetido a cirurgia bariátrica e uma hora e meia (1,5h) após ter tomado 60 mg de omeprazol, representando uma concentração de omeprazol de 341,29 ng/mL.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Quando se trata da aplicação de um método para análise de amostras biológicas a validação passa a ser uma etapa de suma importância para a confiança dos resultados, já que os mesmos obtidos nestas análises são freqüentemente usados na clínica para diagnósticos e tratamentos de doenças, em estudos de farmacocinética, toxicológicos, farmacologia clínica e não clínica e em estudos ambientais (Peng; Chiou, 1990).

A validação de uma metodologia analítica é usada para garantir que os requisitos para uma determinada aplicação específica sejam atendidos. Esta etapa pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (Eurachem, 2000).

Definições na Farmacopéia Americana sugerem que a validação tem por obrigação assegurar que o método quando validado tenha credibilidade durante o uso rotineiro e também, algumas vezes, menciona que deve fornecer documentos que comprovam que o método realiza aquilo para o qual foi destinado (Swqrzt; Krull, 1998).

Para alguns fármacos, a relação dose/concentração plasmática varia consideravelmente entre pacientes e esta alta variabilidade, é principalmente devido a variações significativas na farmacocinética, particularmente na absorção e eliminação. Portanto, em algumas terapias é imprescindível o ajuste de dosagem a fim de atingir a máxima eficácia terapêutica sem reações adversas (Rasmussem; Brosen, 2000).

Este estudo demonstrou a validação de um método analítico para quantificação de omeprazol em plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica objetivando a possível necessidade de ajuste de dosagem, uma vez que existem artigos que relatam que é característico deste tipo de cirurgia alterações na absorção de fármacos, tais como os inibidores da bomba de prótons (Miller; Smith, 2006).

Existem diversos métodos publicados que relatam o desenvolvimento de metodologias para quantificação de omeprazol, ou até mesmo seus metabólitos, porém com procedimentos de extração que envolvem líquido-líquido, que é um processo muito pouco seletivo na separação do analito da matriz biológica, visto que

muitos interferentes podem ter a mesma afinidade pelo solvente do analito. Outro fator que deve ser levado em consideração, é que estes trabalhos não aplicaram a metodologia na clínica (Yuen et al., 2001, Hofmann et al., 2005, Resk et al., 2006).

A padronização do método para detecção e quantificação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por ultravioleta fundamentou-se no procedimento inicial de extração da amostra da matriz biológica (plasma), sendo este o passo mais importante no desenvolvimento de um método. A extração em fase sólida utilizando uma SPE 18 Lt foi crucial para o aumento da porcentagem de recuperação do fármaco e eliminação de grande parte dos interferentes, além disso, apresentando gasto mínimo de reagentes, o que é de suma importância devido as leis de proteção ambiental.

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido semelhante a cromatografia líquida, nela é usada uma coluna chamada cartucho de extração, onde está armazenada a fase sólida (podendo esta ser de sílica, quimicamente ligada, C18 ou C8).

Na utilização da coluna de SPE (Figura 10), a etapa de condicionamento é fundamental, nada mais é do que a preparação da mesma para receber a amostra. Seguindo esta etapa, a solução contendo o analito deve ser aplicada no cartucho, de forma que toda a amostra entre em contato com a coluna. Assim, o analito fica retido e, posteriormente para análise, é eluído com um volume de solvente pré-determinado. Neste tipo de extração, o pH da amostra é um fator importante na etapa de otimização, uma vez que para se obter uma boa extração, o fármaco de interesse deve estar na forma ionizada ou não, de acordo com o tipo de SPE utilizada, garantindo uma boa interação com a mesma.

Amostras que possuem muitos contaminantes, como é o caso do plasma, uma lavagem e/ou “clean up” deve preceder a eluição, evitando, assim, que interferentes sejam eluídos juntamente com o analito e atrapalhem a resolução cromatográfica. Este método mostra vantagens em relação a extração líquido-líquido por ser mais econômico, rápido e ter uma capacidade de extração maior, em relação a alguns fármacos.

Figura 10. Mecanismo do procedimento de extração em fase sólida (SPE).

O omeprazol, por ser uma base, é um fármaco que apresenta instabilidade quando exposto a condições ácidas, deste modo, alterações no pH da fase móvel podem alterar significativamente o seu tempo de interação com a coluna cromatográfica de fase reversa. Deste modo, neste estudo foram avaliadas três novas fases móveis para compor o desenvolvimento da metodologia: primeiramente testou-se uma mistura de tampão fosfato 50 mM pH 4,8:acetonitrila na proporção de 65:35 (v/v), posteriormente testou-se tampão fosfato 50 mM pH 6,7:acetonitrila na proporção de 66:34 (v/v) afim de melhorar a resolução cromatográfica dos picos. Ambas as fases testada apresentaram problemas de interferência e resolução. Contudo, utilizou-se uma terceira fase móvel composta de tampão fosfato 50 mM pH 7,0:acetonitrila:metanol nas proporções de 60,5:35:4,5 (v/v/v) e um fluxo de 1,0 mL/min, que permitiu que os interferentes fossem separados adequadamente do analito de interesse (Figura 5).

Esta fase móvel possui como característica primordial que a descarta das demais fases o pH igual a 7,0. Assim, foi possível obter um tempo de retenção favorável para o omeprazol e seu padrão interno (cerca de 6,0 min para o omeprazol e 9,0 min para o padrão interno).

Com tempo de retenção relativamente curto, foi possível um perfil cromatográfico mais simétrico quando comparado com os cromatogramas das

outras fases móveis testadas. Podemos dizer que os cromatogramas apresentaram melhor resolução, evitando assim, dificuldade na análise dos picos e quantificação do analito. Pôde ser observado também uma excelente separação dos picos de interesse (omeprazol e padrão interno) daqueles gerados pelos fatores endógenos do plasma.

A coluna de escolha para esta metodologia foi também de suma importância para alcançar os resultados demonstrados. A coluna Nucleosil C18 (250 x 4 mm, tamanho de partícula 5 µm) permitiu um tempo de retenção ideal para o omeprazol e seu padrão interno. Como tamanho de 250 mm, consequentemente maior quantidade de pratos teóricos, mesmo o omeprazol tendo certa facilidade de ionização em pH ácido, pode-se dizer que o tamanho da coluna auxiliou, de certa forma, para que o fármaco permanecesse mais tempo retido no interior da mesma, melhorando assim, a sua separação.

É importante ressaltar que o tamanho da coluna foi decisivo para está corrida, já que em colunas maiores do que 300 mm, pode existir a possível perda de resolução, devido a diferença de interação do analito com a coluna.

Outra característica importante da coluna Nucleosil é o tamanho das partícula internas (5 µm), que garante uma maior homogeneidade de interação entre amostra e coluna, contribuindo para uma melhor resolução dos picos. Quando o tamanho das partículas internas são maiores, consequentemente menos homogêneas, existe a uma grande possibilidade de formação de calda nos picos devido a uma maior interação de uma parte dos analitos com a sílica do que a outra.

O comprimento de onda utilizado (294 nm) mostrou ser específico para os tipos de fármaco analisado. O método de HPLC-UV é versátil e de fácil manuseio em laboratório de monitorização terapêutica além disso, o custo das análises são mais condizentes com a rotina do que aqueles desenvolvidos por LC-MS (Woolf; Matuszewski, 1998, Hofmann et al., 2006).

No processo de validação, a construção da curva de calibração foi realizada com oito pontos contemplando as concentrações de 10,0 a 625,0 ng/mL (Figura 6 (A)). O limite de quantificação foi de 5,0 ng/mL (Tabela 4) com linearidade compreendendo a faixa de 5 a 1250 ng/mL (Figura 6-B). Como apresentado, todas as curvas construídas durante o processo de validação obtiveram valores de coeficiente de correlação (r^2) acima de 0,999, mostrando que os valores estão de acordo com os preconizados pela órgão vigente, ANVISA.

Os ensaios de precisão e exatidão mostraram valores de 2,8 a 7,0% e 96,5 a 107,4, respectivamente (Tabela 2). Os valores de recuperação para o processo de extração ficaram acima de 90 % (Tabela 3). Outras vantagens desta metodologia, além da rapidez da análise, foram a quantidade de amostra utilizada (500µL), a especificidade frente a outros fármacos (Tabela 6) e a estabilidade das soluções-padrão, padrão interno e amostra (4 meses quando conservadas a - 20°C).

A metodologia apresentada neste trabalho foi aplicada na análise de omeprazol em plasmas de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Através da análise da tabela 7 foi possível observar que houve mudanças na biodisponibilidade do fármaco quando comparado os dados anteriores e posteriores ao procedimento cirúrgico. Esta diferença se mostrou significativa com valores de p (nível de significância) menores que 0,05 para o teste de Wilcoxon (Figura 8).

A diferença de concentração pode ser explicada pela inativação da porção inicial do intestino delgado, que é a principal via de absorção de nutrientes e fármacos. Existem estudos em pacientes bariátricos que comprovam deficiência de ferro, devido à diminuição da interação dos alimentos com o suco gástrico, responsável pela oxidação do Fe^{+2} , forma insolúvel do ferro, a Fe^{+3} , forma solúvel; de vitamina B12, devido a falta de contato com fator intrínseco, que é necessário para a absorção da mesma; e de folato e cálcio, que ocorrem porque o duodeno, principal local de absorção destes nutrientes, é de certa forma ignorado (Martin et al., 2000, Burt et al., 2005).

A considerável redução no comprimento intestinal provocado pelo *by pass*, provoca uma grande redução no tempo de interação do fármaco com a mucosa intestinal, isso prejudica o transporte do fármaco da luz intestinal para as células, fator que é definitivo em preparações que utilizam fórmulas de liberação controlada. Outro fator associado a diminuição da biodisponibilidade é a diminuição do contato físico do fármaco com as microvilosidades intestinais, diminuindo a área superficial de interação e, conseqüentemente, a taxa de absorção (Edminston et al., 2004).

Embora os pacientes apresentem diferenças nos valores de concentrações de omeprazol antes e após cirurgia, ainda não está completamente elucidado se a biodisponibilidade deste fármaco foi alterada devido a mudança na fisiologia do sistema gástrico. Para isso, existe a necessidade de estudos mais aprofundados que possam evidenciar melhor o grau de influência que a cirurgia bariátrica pode exercer sobre a biodisponibilidade destes.

A cirurgia bariátrica tornou-se um tratamento comum para pacientes com obesidade grau III, é grande a necessidade de estudos que retratam a monitorização terapêutica desses pacientes, garantindo a eficácia do tratamento. Como a anatomia digestiva foi alterada, pode ser também necessário que uma mudança na alteração da forma da farmacoterapia (cápsula oral, comprimidos, suspensão, intravenosa, entre outros) e/ou escolha da medicação (regular ou liberação controlada) seja condizente para este tipo de pacientes.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado para a determinação e quantificação de omeprazol em plasma humanos por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou-se adequado e aplicável para estabelecer correlação entre as concentrações plasmáticas no pré e no pós cirurgia. Isto foi ratificado pelos excelentes resultados obtidos nos parâmetros analíticos de validação .

Foi possível também observar diferenças nas concentrações de omeprazol antes e após os pacientes serem submetidos a cirurgia bariátrica. Deste modo, fica claro a necessidade da realização de monitorização terapêutica nestes pacientes visando uma melhor resposta farmacológica. Este estudo mostrou um alertar não apenas para o fármaco em questão, mas também para outros fármacos utilizados por via oral que possam vir a sofrer algum tipo de alteração de biodisponibilidade provocado pelo procedimento cirúrgico.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: **ANVISA**, 2003.

Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani K, Okabe S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, p. 109-127, 2003.

Alves LF, Gonçalves RM, Cordeiro GV, Lauria MW, Ramos AV. Beribéri Pós Bypass Gástrico: Uma Complicação Não Tão Rara. Relato de Dois Casos e Revisão da Literatura. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, nº 3, p. 564-568, 2006.

Amini H, Ahmadiani A, Gazerani P. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 824, p. 319-322, 2005.

Bal B, Koch TR, Finelli FC, Sarr MG. Managing medical and surgical disorders after divided Roux-en-Y gastric bypass surgery. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**, v. 7, p. 320–334, 2010.

Bharathi DV, Hotha KK, Jagadeesh B, Chatki PK, Mullangic KTR, Naidub A. Simultaneous estimation of four proton pump inhibitors - lansoprazole, omeprazole, pantoprazole and rabeprazole: development of a novel generic HPLC-UV method and its application to clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 732–739, 2009.

Bosch ME, Sánchez AJR, Rojas FS, Ojeda CB. Analytical methodologies for the determination of omeprazole: An overview. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 831–844, 2007.

Brasileiro-Filho G. Bogliolo Patologia Geral. **4º Edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1047-1067, 2009.

Bregion NO, Silva AS, Salvo VLMA. Estado nutricional e condição de saúde de pacientes nos períodos pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano III, nº 14, 2007.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. **11ª Edição**. Ed. McGraw-Hill, 2006.

Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatrics Surgery: A Systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 1724-1737, 2004.

Burt J. Worth the weight. **Advanced Nursing Practice**, p. 45-47, 2005.

Carvalho PS, Moreira CLCB, Barelli MC, Oliveira FH, Guzzo MF, Miguel GPS, Zandonade E. Cirurgia bariátrica cura síndrome metabólica? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 51, n. 1, p. 79-85, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. **Overweight and obesity: defining overweight and obesity**, 2006.

Chasin AAM, Nascimento ES, Neto LMR, Siqueira MEPB, Andraus MH, Salvadori MC, Fernícola NAG, Gorni R, Salcedo S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

Cheng FC, Ho YF, Hung LC, Chen CF, Tsai TH. Determination and pharmacokinetic profile of omeprazole in rat blood, brain and bile by microdialysis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 949, p. 35-42, 2002.

Chenoweth D, Leutzinger J. The economic cost of physical inactivity and excess weight in American adults. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 3, p. 148-163, 2006.

Edminston CE, Krepel C, Kelly H, Larson J, Andris D, Hennen C, Nakeeb A, Wallace JR. Perioperative antibiotic prophylaxis in the gastric bypass patient: do we achieve therapeutic levels? **Surgery**, v. 136, p. 738-747, 2004.

Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods, A laboratory guide to method validation and related topics. **Eurachem: Teddington**, p. 61, 2000.

Fandiño J, Benchimol AK, Coutinho WF, Appolinário JC. Cirurgia Bariátrica: Aspectos clínico-cirúrgicos e psiquiátricos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 26, p. 47-51, 2004.

Ferraz EM, Arruda PCL, Bacelar TS, Ferraz AAB, Albuquerque AC, Leão CS. Tratamento cirúrgico da obesidade mórbida. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 30, n°. 2, p. 98-105, 2003.

Fujioka K. Follow-up of Nutritional and Metabolic Problems After Bariatric Surgery. **Diabetes Care**, v. 28, n. 2, 2005.

Goldim JR, Pithan CR, Oliveira JG, Raymundo MM. O processo de consentimento livre e esclarecido em pesquisa: uma nova abordagem. **Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 372-374, 2003.

Gokcel, A., Gumurdulu, Y., Karakose, H., Melek-Ertorer, E., Tanaci, N., Basciltutuncu, N., Guvener, N. Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.4, p.49-55, 2002.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. **12ª Edição**. Elsevier/Medicina Nacionais, 2011.

Ha JJ, Choi HJ, Jin JS, Jeong ED, Hyun MH. Liquid chromatographic resolution of proton pump inhibitors including omeprazole on a ligand exchange chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6436–6441, 2010.

Hofmann U, Schwab M, Treiber G, Klotz U. Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 85-90, 2006.

INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza da Medição, **3ª edição Brasileira em Língua Portuguesa**, p. 120, 2003a.

Jia H, Li W, Zhao K. Determination of omeprazole in rat plasma by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 837, p. 112–115, 2006.

Macdonald, I. A. Obesity: are we any closer to identifying causes and effective treatments? **TiPS.**, v.21, p.334-6, 2000.

Macek J, Klíma J, Ptáček P. Rapid determination of omeprazole in human plasma by protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 852, p. 282–287, 2007.

Magee SR, Shih G, Hume A. Malabsorption of Oral Antibiotics in Pregnancy after Gastric Bypass Surgery. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 20, Nº 3, p. 310-313, 2007.

Martin LF, Kathleen MF, Noran TE. Pregnancy after adjustable gastric banding. **Obstetrics & Gynecology**, v. 95, p. 927-930, 2000.

Miller D, Smith KM. Medication and nutrient administration considerations after bariatric surgery. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, 2006.

Nevado JJB, Peñalvo GC, Dorado RMR. Method development and validation for the separation and determination of omeprazole enantiomers in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 127-133, 2005.

Oliveira VM, Linardi RC, Azevedo AP. Cirurgia bariátrica – aspectos psicológicos e psiquiátricos. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, nº 4, p. 199-201, 2004.

Orlando RM, Bonato PS. Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 795, p. 227–235, 2003.

Padwal R, Brocks D, Sharma AM. A systematic review of drug absorption following bariatric surgery and its theoretical implications. **International Association for the Study of Obesity: obesity reviews**, v. 11, p. 41–50, 2009.

Pareja JC , Pilla VF, Neto FC, Neto JSC, Chaim EA, Magro DO. Gastroplastia redutora com Bypass Gastrojejunal em Y de ROUX: conversão para bypass gastrointestinal distal por perda insuficiente de peso - experiência em 41 pacientes. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 42, nº.4, 2005.

Pedrosa IV, Burgos MGPA, Souza NC, Moraes CN. Aspectos nutricionais em obesos antes e após a cirurgia bariátrica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, n. 4, p. 316-322, 2009.

Peng GW, Chiou WL. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 531, n. 12, p. 3-50, 1990.

Pommier F, Sioufi A, Godbillon J. Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desimipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography B**, v. 703, p. 147-158, 1997.

Rambla-Alegre M, Esteve-Romero J, Carda-Broch S. Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 250–256, 2009.

Rasmussen BB, Brosen K. Is Therapeutic Drug Monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of selective serotonin reuptake inhibitors? **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22, p. 143-154, 2000.

Ravelli MN, Merhi VAL, Mônico DV, Aranha N. Obesidade, cirurgia bariátrica e implicações nutricionais. **Revista brasileira em promoção da saúde**, v. 20, nº 4, p. 259-266, 2007.

Resk NL, Brown KC, Kashuba ADM. A simple and sensitive bioanalytical assay for simultaneous determination of omeprazole and its three major metabolites in human blood plasma using RP-HPLC after a simple liquid–liquid extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 314–321, 2006.

Rocha FA, Cattai GBP, Nardo ccs, Junior nn. Tratamento da obesidade: Possibilidades atuais do procedimento cirúrgico e do convencional. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2009.

Santry PH, Lauderdale DS, Cagney KA, Rathouz PJ, Alverdy JC, Chin MH. Predictors of Patient Selection in Bariatric Surgery. **Annals of Surgery**, v. 245, p. 59-67, 2007.

Savarino V, Mario FD, Scarpignato C. Proton pump inhibitors in GORD Na overview of their pharmacology, efficacy and safety. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 135-153, 2009.

Scalon D, Fernandes WVB. Abordagem Osteopática na Gastrite. **Revista Inspirar - movimento & saúde**, v. 2, nº 2, 2010.

Schubert ML, Peura DA. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

Segal A, Fandiño J. Indicações e contra-indicações para realização das operações bariátricas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24 (Supl III), p. 68-72, 2002.

Shimizu M, Uno T, Niioka T, Yau-Furukori N, Takahata T, Sugawara K, Tateishi T. Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. **Journal of Chromatography B**, v. 832, p. 241–248, 2006.

Swartz ME, Krull IS. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical & Technology**, p. 12-18, 1998.

Valezia AC, Brito SJ, Junior JM, Brito EM. Estudo do padrão alimentar tardio em obesos submetidos à derivação gástrica com bandagem em Y- de- Roux: comparação entre homens e mulheres. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 35, nº. 6, p. 387-391, 2008.

Vedana EHB, Peres MA, Neves J, Rocha GC, Longo GZ. Prevalência de obesidade e fatores potencialmente causais em adultos em região do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, nº. 7, 2008.

Villela NB, Neto OB, Curvello KL, Paneili BE, Seal C, Santos D, Cruz T. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición Hospitalaria**, v. XIX, p. 367-371, 2004.

Xanthakos SA, Daniels SR, Inge TH. Bariatric surgery in adolescents: an update. **Adolescent Medicine**, Philadelphia, v. 17, nº3, p. 589-612, 2006.

Woolf EJ, Matuszewski BK. Simultaneous determination of omeprazole and 59-hydroxyomeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 828, p. 229-238, 1998.

World Health Organization. Obesity and overweight. **Report of the WHO consultation on obesity**, Geneva, WHO, 2006.

Yuen KH, Choy WP, Tan HY, Wong JW, Yap SP. Improved high performance liquid chromatographic analysis of omeprazole in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 715-719, 2001.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 117/2011
kms

Ribeirão Preto, 16 de dezembro de 2011.

Ao
PÓS-GRADUANDO SAMUEL REMOTTO ALVES FERREIRA
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz
DACTB / FCFRP / USP

Prezado Pós-graduando,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 98ª Sessão Ordinária, realizada em 14/12/2011, o projeto de pesquisa intitulado "METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE OMEPRAZOL EM PLASMA DE PACIENTES BARIÁTRICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: CORRELAÇÃO ENTRE DOSE ADMINISTRADA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA NO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 246**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE *deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar de um estudo clínico conduzido pelos doutores Wilson Salgado Junior e Camila Scalassara Campos intitulado “Influência da cirurgia bariátrica na absorção do medicamentos metformina”.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça perguntas aos médicos Camila e Wilson da equipe de cirurgia bariátrica, caso tiver alguma dúvida.

O senhor é portador de obesidade mórbida e está dentro do programa de cirurgia bariátrica (cirurgia para perder peso) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Será, portanto, submetido à cirurgia para reduzir o tamanho do estômago, conforme já era de seu conhecimento e aprovação.

Má absorção de medicamentos é um possível efeito da cirurgia bariátrica, podendo resultar em diminuição da eficácia da droga. Entretanto poucos estudos avaliaram as consequências da cirurgia na absorção destes medicamentos.

O objetivo desse estudo é avaliar a absorção do omeprazol antes e após a cirurgia bariátrica. Será necessário, para tanto, coleta de sangue. O benefício do estudo é o de permitir elucidar se o medicamento está sendo efetivo em sua ação ou se será necessário que este seja substituído ou ao menos tenha a sua dosagem modificada.

O(A) senhor(a) será submetido(a) a coleta de sangue por meio de um cateter que será colocada em uma veia do braço um (1) mês antes à cirurgia e um (1) mês após a cirurgia. Ao todo serão quatro coletas de sangue de quatro (4) ml cada, duas (2) serão feitas no pré-operatório e duas (2) no pós-operatório.

Os riscos deste estudo estão relacionados apenas com o acesso venoso. Existe o risco de perder o acesso e ter que puncionar outra veia, assim como também existe o risco do desenvolvimento de flebite (inflamação da veia).

A sua participação no estudo é voluntária e a decisão de participar depende somente do(a) senhor(a). Caso decida participar o(a) senhor(a) deverá assinar este documento chamado “Consentimento Livre e Esclarecido”.

O senhor poderá desistir do estudo a qualquer momento e isso em nada afetará o seu atendimento neste hospital.

As informações sobre sua condição de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. O(A) senhor(a) será identificado com um número e os dados serão

relacionados a esse número. Somente seus médicos saberão que as informações são relativas ao senhor. Os resultados deste estudo serão publicados em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

Se o senhor(a) tiver algum problema de saúde no período do estudo, ou sempre que tiver dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com o Dr. Wilson Salgado Junior pelo telefone: (16) 9214-5176.

Eu li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia deste “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames em revistas médicas nacionais ou internacionais. **Entendi que todos os resultados serão analisados de maneira confidencial.**

Eu, _____,
portador do RG nº _____, declaro que, após
convenientemente esclarecido(a) pela pesquisador(a) e ter compreendido o quê me foi
explicado, concordo em participar da pesquisa, por livre e espontânea vontade.
Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2011

Assinatura do paciente

Dr. Wilson Salgado Junior

OBS: Para esclarecimentos ou desistência, favor entrar em contato com:

→ Samuel Remotto Alves Ferreira – (16) 8198-6989

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Laboratório de Análises
Toxicológicas - samuelfre@fcrp.usp.br

→ Dra. Regina Helena Costa Queiroz – (16) 3602-4703

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Laboratório de Análises
Toxicológicas - rqueiroz@fcrp.usp.br