UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Luiza Saldanha Ribeiro Barros
Orientadora: Prof[a]. D[ra]. Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 23/03/16. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Barros, Luiza Saldanha Ribeiro
Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2016.
100 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto

1. Eletroforece capilar. 2. Lamotrigina. 3. HF-LPME. 4. DLLME

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^{a}. D^{ra}. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Liége e Hiram, por toda dedicação, amor, confiança e por sempre acreditarem em mim.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por essa oportunidade de crescimento e pela força necessária para superar as dificuldades.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, por sempre me entenderem e sempre acreditarem em mim.

À Profa. Dra. Cristiane Maseto de Gaitani por todas as discussões científicas, tempo, dedicação, carinho e por tornar possível esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por todos os ensinamentos, apoio e por sempre me receber em seu laboratório.

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos: Fernando, Jennifer, Larissa, Letícia, Luciana e Maíra pelas discussões científicas, e por tornar o dia a dia mais alegre. À Mariana pelo carinho e pela infinita disposição em ajudar. Aos amigos Aline e Rodrigo pela amizade, calma, apoio e infindáveis ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de metabolismo in vitro e técnicas de separação, principalmente a Nayara e Simone pelo carinho no nosso convívio. Um agradecimento especial ao Daniel pela ajuda na realização de parte deste trabalho.

À minha amiga Flávia pela amizade, ajuda e disposição.

Ao programa de pós-graduação em toxicologia, em especial à Rose e à Rosana pela dedicação e paciência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BARROS, L. S. R. **Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar.** 2016. 98f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A lamotrigina (LTG) é um fármaco pertencente à classe das feniltriazinas utilizado no tratamento de crises epilépticas generalizadas e focais e no tratamento adjunto da epilepsia refratária. Devido à alta variabilidade interindividual, às interações medicamentosas e aos efeitos adversos apresentados durante a administração da LTG, a monitorização terapêutica nos pacientes que fazem uso deste fármaco é necessária para ajuste de dose individual e evitar os efeitos adversos. Assim, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de duas técnicas de microextração: a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para análise da lamotrigina em amostras de plasma de pacientes epilépticos. Primeiramente foram definidas as condições eletroforéticas: foi utilizado um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo. O eletrólito de corrida (BGE) foi composto por ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES), na concentração de 130 mmol L^{-1} e pH 5,0. As análises foram realizadas à temperatura de 20°C e tensão de 15 kV. A amostra foi injetada hidrodinamicamente (0,5 psi por 10 s) e a detecção foi feita em 214 nm. Nestas condições a LTG e o padrão interno (PI), lidocaína, puderam ser analisados em menos de 7 minutos. A HF-LPME foi avaliada no modo de 3 fases, usando 500 µL de plasma e 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 como fase doadora. O solvente utilizado para impregnar a fibra foi o 1-octanol. Como fase aceptora foram utilizados 60 µL de solução de ácido clorídrico pH 4,0. Para avaliação da DLLME, foi necessária uma etapa de pré-tratamento da amostra (500 µL de plasma) com 1 mL de acetonitrila. Após isto, 1,3 mL do sobrenadante foram adicionados a 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 e 120 µL de clorofórmio (solvente extrator) foram injetados nesta amostra aquosa e 165 µL de fase sedimentada foram recuperados. As características de desempenho analítico para ambos os métodos foram avaliadas, sendo obtida linearidade na faixa de concentração plasmática de 1-20 µg/mL e limite inferior de quantificação (LIQ) de 1 µg mL^{-1}. Os ensaios de precisão e exatidão apresentaram valores de acordo com os guias oficiais. Além disso, os métodos foram seletivos, não apresentaram efeito residual e as amostras foram estáveis. Os valores de recuperação foram de 54,3 e 23% para HF-LPME e DLLME, respectivamente. Os métodos validados foram aplicados com sucesso em amostras de plasma de pacientes epilépticos em tratamento com a LTG. Além disso, as duas técnicas foram comparadas e a HF-LPME apresentou vantagens em relação à DLLME, mostrando ser uma técnica promissora para análise de matrizes complexas, com reduzido consumo de solvente orgânico e possibilidade de automação.

Palavras-chave: lamotrigina, eletroforese capilar, plasma, microextração em fase líquida com fibras ocas, microextração líquido líquido dispersiva.

ABSTRACT

BARROS, L. S. R. **Evaluation of microextraction techniques to analysis of lamotrigine in plasma samples of epileptic patients by capillary electrophoresis.** 2016. 98f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Lamotrigine (LTG) is an antiepileptic drug, which belongs to the class of phenyltriazine that can be used in the treatment of new-onset and refractory epilepsy. Due to its high interindividual variability, drug interactions and the adverse effects presented during the LTG administration, therapeutic drug monitoring is very important to dose adjustment and to avoid toxicity effects. Thus, the goal of this study was to develop and validate two microextraction techniques: the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) to analyze LTG in plasma samples of epileptic patients. First of all, the eletroforetic conditions were optimized. A fused-silica uncoated capillary with 75 µm internal diameter, and 50 cm effective length was used. The 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 130 mmol L^{-1} pH 5.0 was chosen as background electrolyte (BGE). The temperature and the voltage were kept constant at 20°C and 15 kV respectively. For sample injection, hydrodynamic injection mode was used, with a pressure of 0.5 psi applied for 10 s. The wavelength was set at 214 nm. Under final conditions, LTG and the internal standard (IS) lidocaine were analyzed in less than 7 minutes. HF-LPME was evaluated in the three phase mode. The analyte was extracted from 4.0 mL of a basic donor phase (composed of 500 µL of plasma and 3.5 mL of sodium phosphate solution 50 mmol L^{-1} pH 9.0) into an organic phase composed of 1-octanol immobilized in the pores of the hollow fiber, and further into an acidic acceptor phase (hydrochloric acid solution pH 4.0) placed in the lumen of the fiber. To evaluate DLLME, the plasma samples were pretreated to remove the proteins, and 500 µL of plasma sample was mixed with 1 mL of acetonitrile. After that, 1,3 mL of the upper layer was added to 4 mL of sodium phosphate solution 50 mmol L^{-1} pH 9.0, and 120 µL of chloroform (extracting solvent) was rapidly injected in the aqueous sample and 165 µL of the sedimented phase was collected. Under the optimized conditions, both methods were linear over the plasmatic concentration range of 1.0–20.0 µg mL^{-1} and the lower limit of quantification (LLOQ) was 1.0 µg mL^{-1}. Both methods showed good precision, accuracy, selectivity to LTG, with no carryover and the samples were stable under the studied conditions. The recovery were 54,3 and 23% to HF-LPME and DLLME respectively. The validated methods were successfully applied for the quantification of LTG in plasma samples of epileptic patients. The techniques were compared and HF-LPME was more advantageous for being more suitable to analysis of complex matrices using small amount of organic solvent, and also can be automated.

Keywords: lamotrigine, capillary electrophoresis, human plasma, hollow fiber liquid-phase microextraction, dispersive liquid-liquid microextraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da LTG 3

Figura 2 - HF-LPME empregando configuração em “U” (A) e “haste” (r*od-like*) (B) (adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008) 9

Figura 3- Procedimento da DLLME (adaptado de FORTES, 2013).....11

Figura 4 - Fluxograma referente à avaliação das condições para análise da LTG por CE 19

Figura 5 - HF-LPME empregando configuração em “U” (adaptado de MAGALHÃES; BONATO, 2009) 21

Figura 6 - Fluxograma referente ao desenvolvimento da HF-LPME para análise da LTG por CE 22

Figura 7 – Fluxograma referente ao desenvolvimento da DLLME para análise da LTG por CE 24

Figura 8 - Ionização da LTG em diferentes valores de pH (adaptado de http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=lamotrigine&source=fp) 33

Figura 9 - Influência da concentração do BGE no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES pH 5, 30 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi. 34

Figura 10 - Influência do pH do BGE no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1}, 30 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi. 36

Figura 11 - Influência da tensão aplicada no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi.....36

Figura 12 - Influência da temperatura no tempo de migração (A), eficiência e área (B). Condições eletroforéticas: capilar com 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi. 38

Figura 13 - Influência do tempo de injeção da amostra na área da LTG (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, 20°C 39

Figura 14 - Influência do s*tacking* da amostra em diferentes meios de ressuspensão. O eixo x representa a ressuspensão da amostra em 1) MES, 2) água, 3) metanol e 4) solução de metanol:água (1:1, v/v). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 0,5 psi 41

Figura 15 – Eletroferograma referente as condições estabelecidas para análise da LTG e do PI.....42

Figura 16 - Efeito do solvente orgânico na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 50 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0.....44

Figura 17 - Influência do tempo de agitação na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol.....45

Figura 18 - Influênciada velocidade de agitação na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol.....46

Figura 19 - Influência do pH da fase doadora na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3**,**5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol.....47

Figura 20 - Influênciado pH da fase aceptora na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 e fase aceptora ácido clorídrico. Solvente orgânico: 1-octanol.....48

Figura 21 - Influência da adição de sal na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9.0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 4. Solvente orgânico: 1-octanol.....49

Figura 22 – Eletroferograma da (A) amostra fortificada com LTG e extraída pela HF-LPME nas condições selecionadas. 1) PI e 2) LTG 10µg mL^{-1}; (B) amostra de plasma branco extraído por HF-LPME nas mesmas condições.....49

Figura 23 - Eletroferograma referente à análise da amostra de plasma de um paciente em tratamento com a LTG. 1) PI e 2) LTG (concentração de 10,23µg mL^{-1}) 54

Figura 24 - Concentrações plasmáticas da LTG em paciente epilépticos. F= sexo feminino, M= sexo masculino 54

Figura 25 - Avaliação do solvente orgânico para precipitar as proteínas plasmáticas para extração da LTG por DLLME. Volume do solvente para precipitação: 1 mL. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio. 56

Figura 26 - Influência do volume do solvente orgânico para precipitar as proteínas plasmáticas na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio.....57

Figura 27 - Influência do pH da fase aquosa na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio.....58

Figura 28 - Influência do tipo de solvente extrator na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL.....59

Figura 29 - Efeito do volume do solvente extrator na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: clorofórmio 60

Figura 30 - Avaliação da DLLME assistida por *vortex* (30A) e ultrassom (30B) na extração da LTG em diferentes tempos. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 120 µL de clorofórmio.....61

Figura 31 - Influência da adição de sal na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 120 µL de clorofórmio.....61

Figura 32 - Eletroferograma referente à análise de (A) amostra fortificada com LTG e extraída por DLLME nas condições otimizadas. 1) PI e 2) LTG 10 µg mL^{-1} ; (B) amostra de plasma branco extraído por DLLME 62

Figura 33 - Eletroferograma de uma amostra de plasma de paciente sob tratamento com a LTG após o processo de extração pela DLLME. 1) PI e 2) LTG 4,7 µg mL^{-1} .65

Figura 34 - Concentrações plasmáticas da LTG em paciente epilépticos. F= sexo feminino, M= sexo masculino 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da LTG em amostras biológicas 6

Tabela 2 - Condicionamento do capilar 32

Tabela 3 - Condições estabelecidas para análise da LTG 41

Tabela 4 - Linearidade do método para análise da LTG por HF-LPME 50

Tabela 5 - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas (n=5) do método para análise da LTG por HF-LPME 51

Tabela 6 - Estabilidade (n=5) do método para análise da LTG por HF-LPME 52

Tabela 7 - Estabilidade (n=3) da solução padrão da LTG 53

Tabela 8 - Linearidade do método para análise da LTG por DLLME 63

Tabela 9 - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas[a] (n=5) do método para análise da LTG por DLLME.....64

Tabela 10 – Comparação da quantificação da LTG pela HF-LPME e DLLME.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BGE	Eletrólito de corrida
CE	Eletroforese capilar
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector por arranjo de diodos
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
E	Fator de enriquecimento
EMA	European medicines agency
EOF	Fluxo eletrosmótico
EPR	Erro padrão relativo
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FDA	Food and drug administration
GC	Cromatografia gasosa
HCl	Ácido clorídrico
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibras ocas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida
LSQ	Limite superior de quantificação
LTG	Lamotrigina
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
NaOH	Hidróxido de sódio
PI	Padrão interno

r	Coeficente de correlação
R	Recuperação
SAT-FCFRP/USP	Serviço de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
SDME	Microextração em gota suspensa
SPE	Extração em fase sólida
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Epilepsia 1
1.2 Lamotrigina 2
1.3 Técnicas de microextração 7
1.3.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) 7
1.3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) 10
2. OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo geral 15
2.2 Objetivos específicos 15
3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS 17
3.1 Equipamentos 17
3.2 Reagentes e solventes 17
3.3 Capilar 18
3.4 Soluções padrão de LTG e lidocaína 18
3.5 Avaliação das condições para análise da LTG por CE 19
3.6 Amostras de plasma 20
3.7 Aspectos éticos do estudo 20
3.8 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários com epilepsia 20
3.9 Preparo das amostras de plasma 20
3.10 HF-LPME 21
3.11 DLLME 23
3.12 Validação do método analítico 24
3.12.1 Linearidade 25
3.12.2 Precisão, exatidão e LIQ 25
3.12.3 Seletividade 26
3.12.4 Efeito residual 26
3.12.5 Estabilidade 27

3.13 Cálculo da recuperação **28**
3.14 Aplicação do método **28**
3.15 Comparação dos métodos **29**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **31**
4.1 Avaliação das condições para análise da LTG por CE **31**
4.1.1 Condicionamento do capilar 31
4.1.2 Composição, concentração e pH do BGE 32
4.1.3 Efeito da tensão aplicada 36
4.1.4 Efeito da temperatura 37
4.1.5 Efeito do tempo de injeção da amostra 38
4.1.6 Pré-concentração *online* – *Stacking* mediado por força iônica 39
4.1.7 Condições estabelecidas 41
4.1.8 Depleção do BGE 42
4.2 Avaliação da HF-LPME para análise da LTG em plasma **43**
4.2.1 Efeito do solvente orgânico na fibra 44
4.2.2 Efeito do tempo de agitação 45
4.2.3 Efeito da velocidade de agitação da amostra 46
4.2.4 Efeito do pH da fase doadora 47
4.2.5 Efeito do pH da fase aceptora 48
4.2.6 Efeito s*alting out* 48
4.2.7 Condições estabelecidas para a HF-LPME 49
4.3 Validação do método analítico **50**
4.3.1 Linearidade 50
4.3.2 Precisão, exatidão e LIQ 50
4.3.3 Seletividade 51
4.3.4 Efeito residual 52
4.3.5 Estabilidade 52
4.3.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos 53
4.4 Avaliação da DLLME para análise da LTG em plasma **54**
4.4.1 Pré-tratamento da amostra por precipitação proteica 55
4.4.2 Efeito do pH da fase aquosa 57
4.4.3 Efeito do tipo de solvente extrator 58
4.4.4 Efeito do volume do solvente extrator 59
4.4.5 DLLME assistida por *vortex* e ultrassom 60

4.4.6 Efeito *salting out* na amostra 61
4.4.7 Condições estabelecidas para extração da LTG por DLLME 62
4.5 Validação do método analítico.....62
4.5.1 Linearidade e LIQ 62
4.5.2 Precisão e exatidão 63
4.5.3 Seletividade 64
4.5.4 Efeito residual 64
4.5.5 Estabilidade 65
4.5.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos .65
4.6 Análise estatística dos pacientes nos métodos da HF-LPME e DLLME ...66
4.7 Comparação entre HF-LPME e DLLME 67
5. CONCLUSÃO 70
Referencias.....72
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.....81

Introdução

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação"
(Simone de Beauvoir)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela predisposição a geração de crises epilépticas. Estas crises são ocorrências transientes e imprevisíveis de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal e excessiva (FISHER et al., 2005). A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (MOSHÉ et al., 2015) e sua etiologia pode ser classificada em: genética, quando as crises são resultado direto de um defeito genético; estrutural/metabólica, que envolvem lesões do tipo derrame, traumatismo e infecção; ou de causa desconhecida (BERG et al., 2010). Os pacientes com essa desordem podem sofrer discriminação, falta de compreensão de outras pessoas e dificuldade de viver com uma doença imprevisível que pode comprometer as atividades diárias (MOSHÉ et al., 2015).

As crises epilépticas podem ser englobadas em três categorias principais denominadas generalizadas, focais ou desconhecidas. As crises generalizadas são caracterizadas por início rápido, com comprometimento da rede de neurônios de ambos os hemisférios cerebrais (BERG et al., 2010) e perda imediata da consciência como uma de suas características mais marcantes (RANG et al., 2008); as crises focais ocorrem em apenas um dos hemisférios cerebrais, entretanto, podem abranger mais de uma rede de neurônios e, consequentemente, gerar mais de um tipo de crise, porém cada qual possui seu próprio sítio de iniciação da crise (BERG et al., 2010) e as crises desconhecidas, que são assim chamadas por não haver evidências suficientes para caracterizar a crise como focal ou generalizada (MOSHÉ et al., 2015). Elas podem diferir entre si de acordo com a localização onde são desencadeadas no cérebro, padrões de propagação, maturidade cerebral, medicamentos usados pelos pacientes, dentre outros fatores. Essas crises podem afetar as funções motoras, sensoriais e/ou autônomas, bem como a consciência, estado emocional, memória, cognição e/ou comportamento. É importante lembrar que nem todos os tipos de crise afetam todas essas funções, mas influenciam em pelo menos uma delas (FISHER et al., 2005). Os sintomas podem ganhar a forma de um breve lapso de atenção à convulsão com duração de alguns minutos, bem como sensações ou comportamentos estranhos (RANG et al., 2008).

O diagnóstico da epilepsia é crítico, pois dificilmente um paciente tem uma crise epiléptica no primeiro contato com o médico, desse modo, o relato de parentes sobre os sintomas apresentados no momento da crise é de grande importância (OGUNI, 2004). Juntamente com esses relatos, o diagnóstico da epilepsia está relacionado com o histórico pessoal e familiar, sintomas apresentados, idade em que surgem as crises e estado cognitivo e neurológico do paciente (MOSHÉ et al., 2015). Além disso, exames podem auxiliar no diagnóstico, como o eletroencefalograma, para identificar a atividade neurológica anormal, tomografia computadorizada e ressonância magnética para determinação de anormalidades cerebrais (OGUNI, 2004).

O tratamento é comumente feito com fármacos antiepilépticos que visam inibir a descarga neuronal anômala, mas não conseguem corrigir a causa subjacente, sendo eficazes em controlar cerca de 75% dos casos (RANG et al., 2008). Esses fármacos são escolhidos de acordo com o tipo de crise, idade e sexo do paciente, efeitos adversos apresentados, potencial de interação medicamentosa, dentre outros fatores (MOSHÉ et al., 2015). Apesar da monoterapia ser a principal escolha para o tratamento das crises por evitar interações medicamentosas, muitos pacientes necessitam da administração simultânea de mais de um fármaco antiepiléptico para alcançar melhor controle clínico da doença. Porém, a administração de vários antiepilépticos geralmente leva a mudanças nas interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, com aumento de possíveis manifestações de efeitos adversos (PUCCI; RAGGI, 2005). Por exemplo, há a necessidade do aumento da dose da LTG quando o paciente se encontra em tratamento com carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e/ou primidona, pois estes são indutores enzimáticos (LANÇAS; SOZZA; QUEIROZ, 2003). Além do tratamento com fármacos antiepilépticos, a cirurgia também pode ser realizada em casos graves e especiais (MOSHÉ et al., 2015). Sendo assim, o tratamento deve ser realizado com base nos riscos e benefícios ao paciente (OGUNI, 2004).

1.2 Lamotrigina

Atualmente, há vários fármacos antiepilépticos que podem ser usados no controle das crises epiléticas. A carbamazepina, a fenitoína, o ácido valpróico, o fenobarbital, a primidona e a etossuximida são exemplos dos primeiros

antiepilépticos empregados na terapia e ainda continuam em uso (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). Já a lamotrigina (LTG), o felbamato, a gabapentina, o topiramato, a tiagabina, a oxcarbazepina, o levetiracetam, a zonisamida e a pregabalina foram lançados no início dos anos 90 e fazem parte dos antiepilépticos de segunda geração, e, mais recentemente, foram lançadas a lacosamida e a rufinamida, de terceira geração (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). A procura por novos fármacos antiepilépticos tem por objetivo promover a segurança do seu uso, com menos efeitos adversos, menos interações medicamentosas e que possam ser empregados em monoterapia (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009).

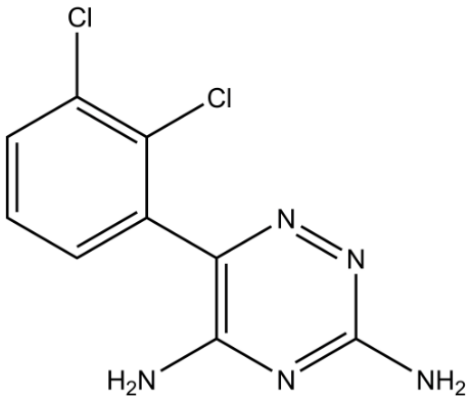

Figura 1 - Estrutura química da LTG

A LTG (Figura 1) é um fármaco pertencente à classe das feniltriazinas (PUCCI et al., 2005). É eficaz no tratamento de crises epilépticas generalizadas e focais, no tratamento adjunto da epilepsia refratária (PUCCI et al., 2005; KIM et al., 2015), pode ser empregada como estabilizador de humor em pacientes com transtorno bipolar (SARACINO et al., 2007; MORGAN et al., 2011; KIM et al., 2015; NIKOLAOU et al., 2015) e no tratamento da síndrome de Lennox-Gastaut (KIM et al., 2015; MOSHÉ et al., 2015). Além disso, estudos demonstraram que a LTG pode ser eficaz no tratamento a dependência de cocaína, álcool e inalantes (ZALEWSKA-KASZUBSKA et al., 2015).

A LTG é comercializada sob a denominação de Lamictal, é quimicamente designada como 6-(2,3 diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina, apresenta a fórmula molecular $C_9H_7N_5Cl_2$ e massa molar de 256,09 g mol^{-1}. Apresenta-se sob a forma de um pó com coloração que varia do branco ao creme. Possui valor de pKa de 5,7, é

pouco solúvel em solução de ácido clorídrido 0,1 mol L^{-1} (4,1 mg mL^{-1} a 25°C) e pouco solúvel em água (0,17 mg mL^{-1} a 25°C) (Food and Drug Administration, 2005). O valor de seu coeficiente de partição (log P) octanol:água é 1,19 em pH 7,6 (DICKINS; CHEN, 2002).

O seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, porém, provavelmente, sua ação ocorre devido ao bloqueio dos canais de sódio voltagem dependente (BRODIE et al., 2011; SARACINO et al., 2007; CHENG; CHOU; HU, 2005): o fármaco interage com esses canais mantendo-os inativados por mais tempo, o que reduz a capacidade dos neurônios de disparar em alta frequência (MCNAMARA, 2007) devido à inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios (BRODIE et al., 2011; SARACINO et al., 2007) como glutamato e aspartato (CHENG; CHOU; HU, 2005).

Sua administração é por via oral e os comprimidos estão disponíveis nas dosagens de 25, 100, 150 e 200 mg (Food and Drug Administration, 2005). A dose diária varia entre 25 a 400 mg (PUCCI et al., 2005). A faixa de concentração plasmática não é bem definida, alguns autores relatam que concentrações entre 1 – 4 µg mL^{-1} são mais comuns, porém em alguns casos concentrações acima de 10 µg mL^{-1} são observados (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; SARACINO et al., 2007; NIKOLAOU et al., 2015; KIM et al., 2015). O pico de concentração plasmática ocorre entre 1 a 5 horas após administração oral (SARACINO et al., 2007; KIM et al., 2015) e cerca de 55% é ligada às proteínas plasmáticas (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; NIKOLAOU et al., 2015). Sua biodisponibilidade é de 98%, apresenta absorção linearmente relacionada à dose (cinética linear) e não é afetada pela presença de alimentos (PUCCI et al., 2005). Sua meia-vida plasmática é de aproximadamente 25 horas, a qual pode ser aumentada para 60 horas na presença de inibidores enzimáticos como o ácido valpróico, ou diminuída para 15 horas na presença de indutores enzimáticos como a carbamazepina, a fenitoína e o fenobarbital (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002). Sua biotransformação é extensivamente realizada via glucuronidação hepática pela uridina 5’-difosfato-glicuronil transferase (UGT1A4) (CHENG; CHOU; HU, 2005; NIKOLAOU et al., 2015) e dá origem ao seu principal metabólito, lamotrigina 2-N-glucuronido, o qual é inativo (SARACINO et al., 2007) e sua eliminação é renal (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; NIKOLAOU et al., 2015).

A incidência de toxicidade está relacionada ao aumento significante das concentrações séricas acima de 15 µg mL^{-1} (ALDAZ et al., 2011). Os efeitos adversos mais observados relacionados ao tratamento com a LTG em monoterapia são tontura, ataxia, sonolência, dor de cabeça, diplopia, visão borrada, náusea, vômito e *rash* cutâneo (SARACINO et al., 2007; HEYMAN et al., 2012).

Devido à alta variabilidade interindividual (SARACINO et al., 2007), às interações medicamentosas (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 20022) e aos efeitos adversos apresentados, o desenvolvimento de metodologias confiáveis, rápidas e simples é importante para realizar a monitorização terapêutica da LTG em plasma de pacientes em tratamento para ajuste de dose individual e evitar os efeitos adversos (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002).

Alguns métodos já foram descritos na literatura para a quantificação da LTG (Tabela 1), utilizando uma ampla variedade de técnicas analíticas. Dentre elas estão a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês, *high performance liquid chromatography*), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*), cromatografia gasosa (GC do inglês, *gas chromatography*), eletroforese capilar (CE do inglês*, capillary electrophoresis*) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*). Esses métodos usaram como técnica de preparo de amostra a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido (LLE do inglês, *liquid liquid extraction*) e a extração em fase sólida (SPE do inglês, *solid phase extraction*). No entanto, a LLE apresenta algumas desvantagens como tendência à formação de emulsão, baixo potencial de automação, necessita de uma grande quantidade de solventes orgânicos de alta pureza, os quais são caros e tóxicos, o que gera resíduos perigosos (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; WILLE; LAMBERT, 2007). Já na SPE há a necessidade do uso de cartuchos que são caros, apresenta problemas na reprodutibilidade devido à diferença entre os lotes de adsorventes (WILLE; LAMBERT, 2007), utiliza altas quantidades de solventes (da ordem de mililitros) e durante o processo com amostras reais o cartucho pode sofrer entupimento (MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011).

Tabela 1 - Análise da LTG em amostras biológicas

Autores	Técnica de análise	Tipo de extração	Matriz	Volume da amostra	Limite de quantificação
Shihabi; Oles, 1996	CE e HPLC	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	0,5 µg mL^{-1}
Theurillat; Kuhn; Thormann, 2002	CE	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	<1 µg mL^{-1}
Zheng et al., 2004	CE-MS	Precipitação proteica	Plasma	100 µL	0,1 µg mL^{-1}
Pucci et al., 2005	MEKC	SPE	Plasma e urina	250 µL	1 µg mL^{-1}
Saracino et al., 2007	HPLC	Precipitação proteica	Plasma	150 µL	0,1 µg mL^{-1}
Hotha et al., 2011	LC-MS/MS	LLE	Plasma	100 µL	2 ng mL^{-1}
Morgan et al., 2011	HPLC	LLE	Plasma	50 µL	0,1 µg mL^{-1}
Shibata et al., 2012	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	1,2 µg mL^{-1}
Nikolaou et al., 2015	GC	SPE	Sangue total	200 µL	0,5 µg mL^{-1}

Assim, devido às desvantagens das técnicas mais tradicionais de preparo de amostra, as pesquisas nesta área tem sido focadas em melhorar esta etapa analítica com o intuito de simplificar, miniaturizar e automatizar esse procedimento. Outra questão em foco é a redução do consumo de solventes orgânicos tóxicos e o desenvolvimento de procedimentos menos danosos ao meio ambiente sem perder o compromisso com a eficiência de extração. Baseado nisso, nos últimos anos as microextrações em fase líquida (LPME do inglês, *liquid-phase microextraction*) vem ganhando espaço no cenário da química analítica, entre elas: a microextração em gota suspensa (SDME do inglês, *sigle drop microextraction*), a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME do inglês, *hollow-fiber liquid-phase*

microextraction) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*) (ASENSIO-RAMOS, et al., 2011).

A SDME é baseada na distribuição do analito entre a fase orgânica (a gota suspensa) e a fase aquosa que contém o analito. Apesar dessa técnica apresentar simplicidade e eficiência, a gota suspensa se torna um problema porque muitas vezes ela pode ser perdida na fase aquosa, o que dificulta a otimização do procedimento. Na HF-LPME o solvente se encontra dentro dos poros da fibra e a fase aceptora no lúmen da fibra, o que permite agitação da amostra sem perda das fases, além das fibras poderem ser descartadas devido ao baixo custo. A DLLME consiste na injeção de uma mistura de solvente extrator e dispersor na amostra aquosa com a formação do ponto nuvem, e sedimentação do analito juntamente com o solvente extrator (HAN; ROW, 2012). Neste projeto foram avaliadas a HF-LPME e a DLLME como técnicas de preparo de amostra. Assim, serão descritos a seguir os conceitos teóricos de ambas as técnicas.

1.3 Técnicas de microextração

1.3.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

Em 1999, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen inovaram o procedimento de microextrações em fase líquida com a introdução de fibras ocas constituídas de polipropileno, para a extração de metanfetamina a partir de amostras de urina e plasma. Desde então, a HF-LPME vem sendo considerada uma evolução dentre as técnicas de microextração em fase líquida por visar o uso reduzido da razão solvente orgânico/ fase aquosa (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A HF-LPME consiste na impregnação dos poros de uma fibra capilar porosa e hidrofóbica (fibra cilíndrica oca) com o solvente orgânico de extração e o preenchimento do seu lúmen com microlitros de uma fase aceptora (RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008).

Devido à sua versatilidade, essa técnica pode ser utilizada de dois modos: com duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão. No sistema de duas fases o analito é extraído da amostra aquosa diretamente para solvente orgânico que se encontra tanto nos poros da fibra quanto no seu lúmen.

Esse processo é ilustrado abaixo (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$\text{Analito}_{\text{(fase doadora)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase aceptora orgânica)}}$$

O modo de duas fases é mais adequado para compostos com alta solubilidade em solventes orgânicos (ARCE et al., 2009). A fase aceptora proveniente do modo de duas fases pode ser diretamente analisada por GC (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010), CE se houver compatibilidade com o eletrólito de corrida ou pode ser evaporada e reconstituída para posterior análise (ARCE et al., 2009; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

No modo de 3 fases o analito é extraído de uma amostra aquosa através do solvente orgânico presente nos poros da fibra, passando para uma solução aquosa presente no lúmen da mesma. Esse modo é limitado para compostos com grupos funcionais ionizáveis com certo grau de hidrofobicidade (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010). Esse processo é ilustrado abaixo (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$\text{Analito}_{\text{(fase doadora)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase orgânica)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase aceptora aquosa)}}$$

Após o processo de extração, a fase aceptora pode ser diretamente analisada por HPLC ou CE (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006).

Em ambos os modos, a eficiência da extração depende do coeficiente de partição do analito entre as fases citadas acima. Assim, um alto fator de enriquecimento pode ser obtido, e calculado pela equação 1 (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$E = \frac{V_d \; x \; R}{100 \; x \; V_a} \qquad \text{(equação 1)}$$

Na qual E corresponde ao fator de enriquecimento (E inglês, *enrichment factor*), V_d é o volume da fase doadora, R é a recuperação e V_a é o volume da fase aceptora orgânica ou aquosa, dependendo do modo de extração empregado.

Independente do modo como esta técnica é realizada, o pH da fase doadora deve ser ajustado para que o composto permaneça em sua forma não ionizada, para diminuir a solubilidade do analito no meio aquoso e favorecer sua passagem para o

solvente orgânico. O pH da fase aceptora, no caso de 3 fases, deve ser ajustado para que o composto se torne ionizado, favoreça sua solubilidade na fase aceptora aquosa e impeça o seu retorno para o solvente orgânico (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006). Posto isso, em relação à eficiência da extração, a mesma é dependente da partição do composto entre: fase doadora $\rightleftharpoons$ solvente orgânico $\rightleftharpoons$ fase aceptora aquosa ou orgânica (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Vários parâmetros podem ser avaliados para melhorar a eficiência de extração do método. Dentre eles, a escolha do solvente orgânico adequado é primordial. Esse solvente precisa ser insolúvel em água para garantir que seja formado um filme na parede da fibra e, além disso, esse solvente deve ser compatível com a fibra para que seus poros sejam preenchidos completamente (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010). Vários solventes orgânicos têm sido utilizados para impregnar a fibra, como éter diexílico, -*n*-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol (DE OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, devido à fase orgânica atuar como uma barreira entre as fases aceptora e doadora, impedindo o contato entre essas duas fases (DE OLIVEIRA et al., 2008), é possível aplicar agitação constante durante a extração sem a perda da fase aceptora (ARCE et al., 2009; RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 2004).

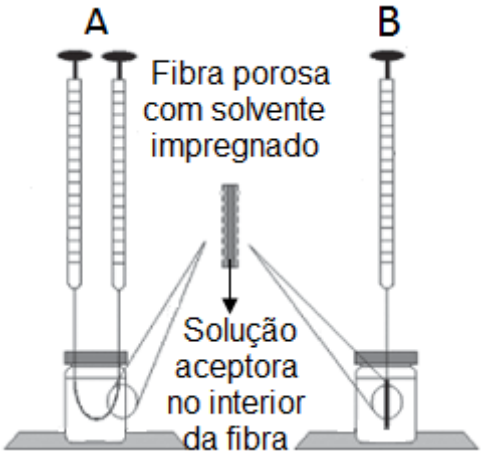

Figura 2 - HF-LPME empregando configuração em “U” (A) e “haste” (r*od-like*) (B) (adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008)

Para realização da extração, a HF-LPME pode ser empregada em duas configurações principais: configuração em "U" (Figura 2A), onde as extremidades da fibra são conectadas a duas ponteiras por onde a fase aceptora é colocada e retirada, e configuração tipo "haste" (*rod-like*) (Figura 2B), onde uma das

extremidades é fechada e a outra é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; ARCE et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2008).

As vantagens dessa técnica são: em virtude do baixo custo das fibras, não é necessária a sua reutilização o que evita problemas de efeito residual (DE OLIVEIRA et al., 2008; RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 1999) e, devido ao diminuído tamanho dos poros da fibra, moléculas grandes são impossibilitadas de atravessar para a fase aceptora (CHA; MYUNG, 2013). Além disso, em apenas um passo, essa técnica combina extração, concentração e limpeza da amostra (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011) o que a torna uma técnica de extração adequada para amostras complexas (CHA; MYUNG, 2013) como o plasma. Ainda, a quantidade de solvente orgânico necessária para impregnar a fibra é normalmente entre 5 – 30 µL (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008) o que corresponde a uma pequena quantidade de solvente orgânico e, consequentemente, diminui a exposição à substâncias tóxicas (CARRÃO et al., 2011). Devido a essa pequena quantidade de solvente orgânico utilizada, atualmente essa técnica é bastante atrativa devido aos princípios da química verde, que tem como base o desenvolvimento sustentável. Um dos conceitos da química verde é a diminuição da produção de resíduos químicos e, consequentemente, diminuição de seu descarte (LENARDÃO et al., 2003). As principais limitações estão relacionadas à dificuldade de extração de analitos altamente polares, entretanto essa situação pode ser contornada com a adição de par-iônico na amostra, e a necessidade do uso de solventes orgânicos com alto ponto de ebulição e imiscíveis em água o que limita a seletividade do método (DE OLIVEIRA et al., 2008).

1.3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi desenvolvida por Rezaee et al. em 2006 para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água. É uma técnica de extração que consiste no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases de extração (fase aquosa, solvente dispersor e solvente extrator) e é ideal para a extração de compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de distribuição alterado pelo controle do pH (analitos ácidos ou alcalinos) (ZANG et al., 2009). A razão entre o volume de fase extratora e fase doadora é muito baixa se comparada a outras técnicas (OJEDA; ROJAS, 2009)

e o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente devido à utilização de um sistema ternário de solventes: amostra aquosa, solvente dispersor miscível tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa e solvente orgânico extrator de alta densidade (ZANG et al., 2009; DIONÍSIO et al., 2010).

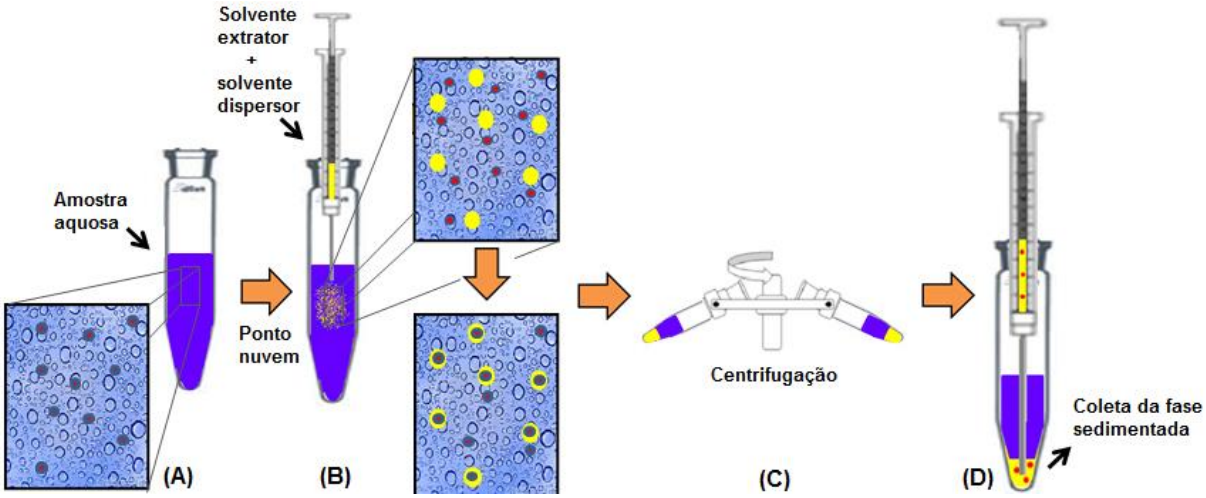

Figura 3 - Procedimento da DLLME (adaptado de FORTES, 2013)

A Figura 3 apresenta o sistema ternário de solventes. A extração acontece quando, com ajuda de uma seringa, a mistura solvente extrator/dispersor é injetada de maneira rápida e forte em um tubo contendo a fase aquosa (amostra) (A). Instantaneamente é formada uma nuvem promovida pela dispersão do solvente extrator na fase aquosa (favorecida pelo solvente dispersor), formando microgotas dispersas por toda a amostra, com grande área superficial, onde ocorre a partição do analito (B) (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). Assim, o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, sendo uma das vantagens desta técnica. Além disso, a razão entre o volume de fase aceptora e de fase doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente, o que permite a obtenção de altos valores de enriquecimento (REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009; HUO et al., 2011). Após a formação do ponto nuvem é realizada a centrifugação, onde as microgotas do solvente extrator e analito são depositadas no fundo do tubo cônico, formando a fase sedimentada (C), que é retirada e analisada (D) (REZAEE, 2006; ZANG et al., 2009).

Os solventes dispersores são escolhidos devido a sua capacidade de miscibilidade tanto no solvente extrator quanto na fase aquosa. Essa característica permite a dispersão do solvente extrator em partículas finas na fase aquosa, de modo que a área superficial do solvente extrator em contato com a fase aquosa, a

qual contém o analito, seja infinitamente grande, o que promove o aumento da eficiência de extração. Os solventes mais utilizados para essa função são o metanol, a acetonitrila e a acetona (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Os solventes extratores são selecionados com base na sua capacidade de extração e, preferencialmente por apresentarem densidade maior que a da água. Os solventes extratores mais utilizados (da ordem de microlitros) são o clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno (REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009; HUO et al., 2011). Outros solventes não halogenados também podem ser usados como 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-dodecanol e n-hexadecano (OJEDA; ROJAS, 2009).

Além da escolha dos solventes e o volume adequado de cada um deles, outros parâmetros importantes a serem estudados na DLLME são o pH e força iônica da amostra e o tempo de extração (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). Na DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura dos solventes na amostra e a centrifugação. Uma vez que a área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa é infinitamente grande, a transferência do analito para o solvente orgânico é quase instantânea, então o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente e o tempo de extração é muito curto (REZAEE et al., 2006). Desse modo, vários autores consideram que o tempo de extração não é um fator significativo (REZAEE et al., 2006; REZAEI et al., 2008; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008; CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Além disso, estudos tem mostrado aumento na eficiência de extração utilizando a DLLME assistida por *vortex* (ZHANG; LEE, 2012) ou ultrassom (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Para avaliação da eficiência de extração desses parâmetros, a recuperação e o fator de enriquecimento podem ser calculados de acordo com as equações 2 e 3 (REZAEE et al., 2006):

$$E = \frac{C_{sed}}{C_0} \qquad \text{(equação 2)}$$

Onde E é o fator de enriquecimento, C_{sed} é a concentração do analito na fase sedimentada e C_0 é a concentração inicial do analito.

$$R = \frac{C_{sed}\ x\ V_{sed}}{C_0\ x\ V_{aq}} \qquad \text{(equação 3)}$$

Onde R é a recuperação da extração (do inglês *extraction recovery*), V_{sed} é o volume da fase sedimentada e $\mathrm{V_{aq}}$ é o volume da amostra aquosa.

As vantagens desta técnica incluem simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento (ZANG et al., 2009; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; OJEDA; ROJAS, 2009; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). As desvantagens são: uso de solventes tóxicos (ALSHANA et al., 2013; RAJABI et al., 2014), todo o processo de extração é manual e a centrifugação é a etapa que demanda maior tempo no processo (REZAEI et al., 2008; FARAJZADEH et al., 2010; BERIJANI et al., 2006; ZAREI; GHOLAMIAN, 2011).

A DLLME é uma técnica de extração muito utilizada para a análise de amostras aquosas. Porém, várias publicações já relataram seu uso para análise de alimentos, frutas, vegetais, assim como amostras biológicas e ambientais (ANDRUCH et al., 2012). Todavia, para realização da DLLME em amostras complexas como o plasma, um pré-tratamento da matriz como precipitação proteica, ultrafiltração, diluição e centrifugação é necessário (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011).

Objetivos

"Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose correta diferencia o veneno do remédio".

(Paracelsus)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar duas técnicas de microextração (HF-LPME e DLLME) para determinação da LTG por CE em amostras de plasma de pacientes em tratamento atendidos pelo Serviço de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (SAT-FCFRP/USP).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise da LTG por CE;
- Desenvolver um método para análise da LTG em amostra de plasma utilizando a HF-LPME;
- Validar o método desenvolvido de acordo com os guias da Anvisa e EMA;
- Aplicar o método em amostras de plasma de pacientes em tratamento e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP;
- Desenvolver um método para análise da LTG em amostra de plasma utilizando a DLLME;
- Validar o método desenvolvido de acordo com os guias da Anvisa e EMA;
- Aplicar o método em amostras de plasma de pacientes em tratamento e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP;
- Comparar as duas técnicas de microextração para análise da LTG em amostras de plasma.

Material, Casuística e Métodos

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina".

(Cora Coralina)

3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Foi empregado um equipamento de CE da Beckman Coulter, modelo P/ACE^{TM} MDQ (Fullerton, EUA), equipado com amostrador automático, um detector DAD (*Diodo Array Detector*) com monitoramento em 214 nm e um sistema de aquisição de dados interligado ao software 32 Karat^{TM} versão 8.0.

Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura obtida do sistema Direct Q3 da Millipore (Bedford, EUA). A balança analítica utilizada nos procedimentos de pesagem foi da marca Sartorius, modelo CP225D (Goettingen, Alemanha). O pHmetro utilizado na medição do pH das soluções de eletrólito foi o PHS-3B da PHTEK (Curitiba, Brasil). Para a degaseificação das soluções foi utilizado um aparelho de ultrassom da Quimis modelo Q3350 (Diadema, Brasil) e, para homogeneizar as soluções, um agitador de tubos Ika modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha). Para a realização das microextrações foram utilizadas uma centrífuga (marca Hitachi e modelo HIMAC CF 15D2, Tóquio, Japão) e um agitador do tipo *vibrax* Ika modelo VXR basic (Staufen, Alemanha).

3.2 Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) empregados para as análises por CE foram o acetato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial (Synth, Diadema, Brasil), ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES) (Sigma, St Louis, EUA) e hidróxido de sódio (Mallinckrodt Chemicals, Estado do México, México). O metanol (grau HPLC) utilizado no preparo das soluções padrões e de trabalho foi obtido da JTBaker (Estado do México, México). As soluções foram filtradas em filtro Milex-HV (Millipore, Bedford, EUA) com fibras de tamanho de poro de 0,45 µm.

Os reagentes (grau analítico) utilizados no procedimento de preparo de amostra por HF-LPME foram o fosfato de sódio bibásico (Synth, Diadema, Brasil), ácido clorídrico (Synth, Diadema, Brasil) e cloreto de sódio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes orgânicos (grau analítico) utilizados foram dibutil éter, 1-octanol, acetato de hexila, acetato de dodecila (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA),

acetato de butila (Sigma Aldrich, Seelze, Alemanha), N,N-dimetilformamida (Mundial Química, São Paulo, Brasil) e n-hexil etér (Alfa Aesar, Ward Hill, EUA).

Os reagentes (grau analítico) utilizados no procedimento de preparo da amostra por DLLME foram o fosfato de sódio bibásico (Synth, Diadema, Brasil), ácido clorídrico (Synth, Diadema, Brasil) e cloreto de sódio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes orgânicos (grau analítico) utilizados foram acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha), metanol, etanol (JT Baker, Estado do México, México), MTBE (JT Baker, Center Valley, EUA), isopropanol, hexano (Panreac, Barcelona, Espanha), acetona (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, EUA), acetato de etila ((Mallinckrodt Chemicals, Estado do México, México), tetracloroetileno, clorofórmio (Tedia, Fairfield, EUA) e diclorometano (Macron Chemicals, Center Valley, EUA).

3.3 Capilar

Para a análise eletroforética foi utilizado capilar de sílica fundida recoberto com poliimida e não revestido internamente (Microsolv, Fullerton, EUA). O diâmetro interno foi de 75 µm, comprimento total de 60 cm e comprimento efetivo de 50 cm. Em CE, a detecção é realizada no próprio capilar. Para isto é necessária a retirada da camada de poliimida na zona de detecção que foi feita queimando uma pequena região (0,5 cm) aproximadamente 10 cm antes do final do capilar. Após esta queima a região foi limpa com auxílio de algodão umedecido com acetona.

3.4 Soluções padrão de LTG e lidocaína

A LTG (pureza 99,9%) foi adquirida da empresa Torrent (Basking Ridge, EUA). A solução estoque (1000 µg mL^{-1}) e soluções de trabalho nas concentrações de 20, 40, 80, 160, 200, 300 e 400 µg mL^{-1} foram preparadas em metanol (grau HPLC). A lidocaína, utilizada como padrão interno (PI), foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e a solução estoque (1000 µg mL^{-1}) e solução de trabalho (100 µg mL^{-1}) também foram preparadas em metanol. As soluções foram armazenadas a – 20°C.

3.5 Avaliação das condições para análise da LTG por CE

A Figura 4 apresenta um esquema geral das etapas para avaliação das condições eletroforéticas. Antes das análises e no final do dia o capilar foi condicionado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1} (20 min) e água ultrapura (20 min). Entre as análises o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} (2 min), água (2 min) e solução de eletrólito de corrida (BGE, do inglês background electrolyte) (3,5 min).

Para a análise da LTG, 25 µL da solução padrão, na concentração metanólica de 80 µg mL^{-1} foram transferidos para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi ressuspenso em 150 µL de diferentes soluções. Para selecionar as condições analíticas, foram avaliados o tipo de BGE (acetato de sódio e MES), diferentes valores de pH do BGE (3, 4 e 5) bem como sua concentração molar (90, 110 e 130 mmol L^{-1}). Além disso, parâmetros como temperatura (15 a 30° C), tensão (15 a 30 kV) e tempo de injeção (5 a 15 segundos) também foram otimizados durante o estudo. Outro parâmetro avaliado foi o *stacking* com a ressuspensão da amostra em diferentes soluções (MES, água ultrapura, metanol ou solução de água:metanol (1:1, v/v). A depleção do BGE também foi avaliada. Para isto, 15 análises consecutivas foram realizadas sem a troca da solução de BGE dos reservatórios. O resultado desse parâmetro foi avaliado de acordo com o coeficiente de variação do tempo de migração da LTG.

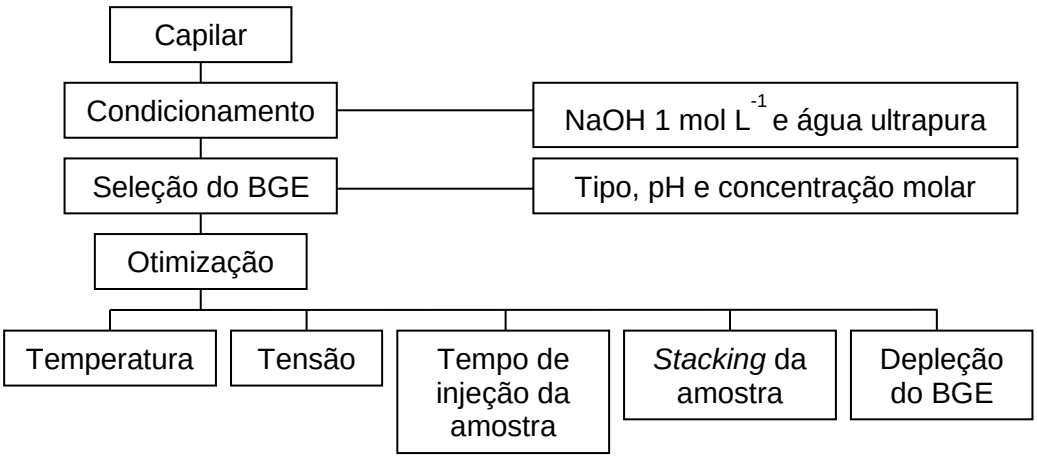

Figura 4 - Fluxograma referente à avaliação das condições para análise da LTG por CE

3.6 Amostras de plasma

As amostras de plasma utilizadas para o desenvolvimento dos métodos foram obtidas pela doação de voluntários sadios da FCFRP-USP. Foram aceitos voluntários cujos plasmas estivessem livres do fármaco em questão (plasma branco). A aplicação do método foi realizada em amostras de plasma de pacientes epiléticos que estavam em tratamento com a LTG. Essas amostras foram obtidas do SAT-FCFRP-USP. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento de uso. As análises foram realizadas no Laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos.

3.7 Aspectos éticos do estudo

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP), Protocolo CEP/FCFRP n°. 284.

3.8 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários com epilepsia

Foram incluídos nesse estudo pacientes (n=12) do sexo feminino ou masculino, a partir dos 18 anos de idade que estavam em tratamento com a LTG e atendidos pelo Serviço de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (SAT-FCFRP/USP).

Foram excluídos desse estudo pacientes menores de 18 anos ou pacientes que não estivessem em tratamento com a LTG.

3.9 Preparo das amostras de plasma

Previamente à etapa de extração do analito por HF-LPME ou DLLME, o plasma utilizado foi centrifugado a 2300 x *g* por 15 minutos para sedimentação de qualquer material particulado.

3.10 HF-LPME

A configuração da HF-LPME usada nesse trabalho foi desenvolvida por Magalhães e Bonato (2009) (Figura 5). Essa configuração é composta por duas ponteiras plásticas (Sorenson Bioscience, EUA) acopladas a uma tampa de poliuretano que evita vazamentos durante a extração. As ponteiras foram ligadas a uma fibra cilíndrica oca porosa (Accurel PP Q3/2, Alemanha) composta de polipropileno, diâmetro interno de 600 µm, espessura da parede de 200 µm, tamanho de poro de 0,2 µm e comprimento de 15 cm.

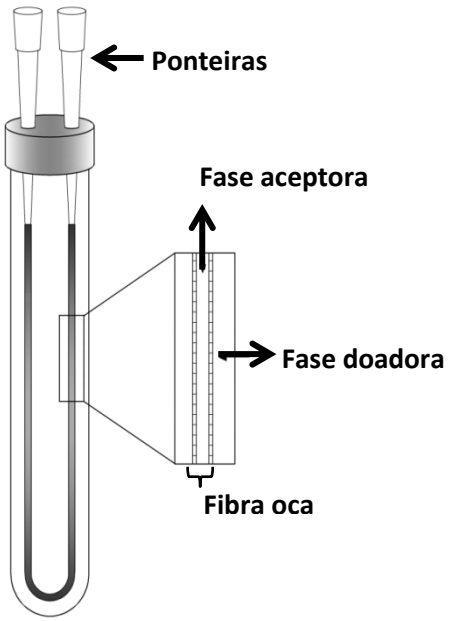

Figura 5 - HF-LPME empregando configuração em “U” (adaptado de MAGALHÃES; BONATO, 2009)

Primeiramente em um tubo de vidro de fundo cônico, 500 µL de plasma previamente centrifugado foi fortificado com 25 µL das soluções de LTG e do PI e então foram adicionados 3,5 mL de solução de fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}.

Para cada amostra foi utilizada uma membrana de 15 cm de comprimento disposta na configuração em U, e em cada extremidade foi fixada uma ponteira. Para a impregnação do solvente na fibra, esta foi imersa no solvente orgânico por 15 segundos em ultrassom e o excesso desse solvente foi removido com água deionizada em ultrassom por 10 segundos. Após isto, a fibra foi então colocada no tubo de fundo redondo de vidro contendo a amostra aquosa (composta de plasma,

LTG, PI e solução de fosfato de sódio) e 60 µL da fase aceptora (ácido clorídrico) foi injetada no interior dessa fibra com o auxílio de uma microseringa (Hamilton, Reno, EUA). A extração foi realizada à temperatura ambiente (22 ± 3°C) e agitação em multi-agitador *vibrax*. Após a agitação, 60 µL da fase aceptora foram recuperados, transferidos pra o *vial* de injeção e misturados a 60 µL de metanol para realização da análise eletroforética. A Figura 6 representa o fluxograma do desenvolvimento da HF-LPME.

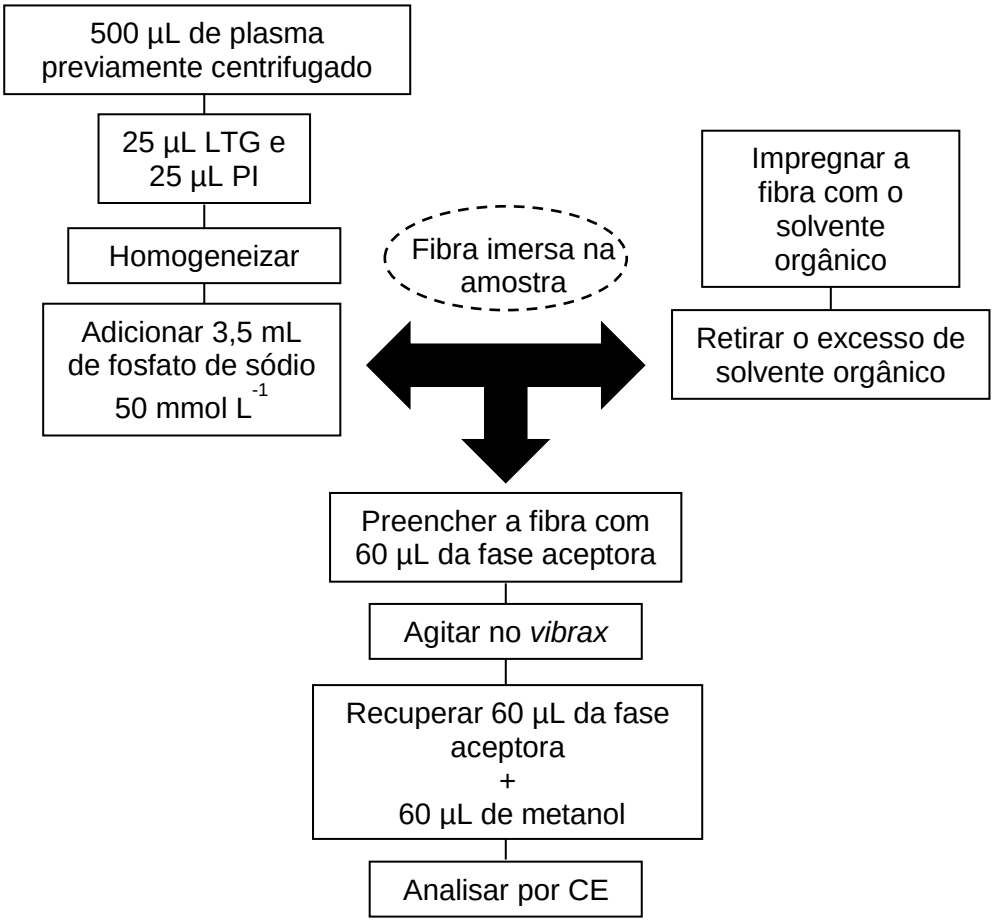

Figura 6 - Fluxograma referente ao desenvolvimento da HF-LPME para análise da LTG por CE

Para garantir os melhores resultados de recuperação, vários parâmetros foram avaliados, dentre eles: tipo do solvente orgânico (dibutil éter, 1-octanol, acetato de hexila, acetato de dodecila, acetato de butila, N,N-dimetilformamida e n-hexil etér), tempo de agitação (5, 15, 30, 50 e 70 minutos), velocidade de agitação (500, 1000 e 1500 rpm), pH da fase doadora (5, 6, 7, 8, 9 e 10), pH da fase aceptora (1, 2, 3 e 4) e efeito da adição de sal (0, 2, 5, 7 e 10%).

3.11 DLLME

Anteriormente à realização da DLLME, é necessária uma etapa de pré-tratamento da amostra (SARAJI; BOROUJENI, 2014). Neste caso foi realizada a precipitação de proteínas plasmáticas. Para isso, em um tubo de fundo redondo, 500 µL de plasma previamente centrifugado foram fortificados com 25 µL das soluções de LTG e do PI. Após isto, 1 mL de solvente orgânico foi adicionado e os tubos foram agitados por 2 minutos a 1500 rpm com o auxílio do *vibrax*. Em seguida, os tubos contendo a amostra foram centrifugados por 15 minutos a 2300 x *g*, 1,3 mL do sobrenadante foi recuperado e transferido para um tubo de fundo cônico. A este sobrenadante foram adicionados 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, e os tubos foram novamente agitados com auxílio do *vortex*. Após isso, o solvente extrator foi rapidamente injetado na amostra (sobrenadante com a solução fosfato de sódio) com auxílio de uma microseringa de vidro para formação do ponto nuvem e os tubos foram centrifugados (por 15 minutos a 4°C e 2300 x *g*), o sobrenadante foi descartado com ajuda de uma pipeta, e a fase sedimentada foi totalmente coletada, transferida para outro tubo de fundo cônico e o solvente evaporado sob fluxo de ar comprimido. O resíduo foi ressuspendido em 100 µL de solução água:metanol (1:1, v/v), transferida pra o *vial* de injeção e realizada a análise eletroforética. A Figura 7 representa o fluxograma do desenvolvimento da DLLME.

Para garantir melhor eficiência na extração, vários parâmetros foram avaliados, dentre eles: tipo do solvente utilizado para precipitação proteica (acetonitrila, metanol, etanol e acetona), volume do solvente para precipitação proteica (0,5, 0,75 e 1 mL). Para a realização da DLLME foram avaliados o pH da fase aquosa (5, 6, 7, 8, 9, 10), tipo do solvente extrator (tetracloroetileno, clorofórmio e diclorometano), volume do solvente extrator (60, 80, 100, 120, 140 e 160 µL). Além disso, foi avaliada a DLLME assistida com o uso de ultrassom (0, 30 e 60 segundos) e agitação com *vortex* (0, 30, 60 e 120 segundos) e efeito s*alting out* (0, 1, 3 e 5 %).

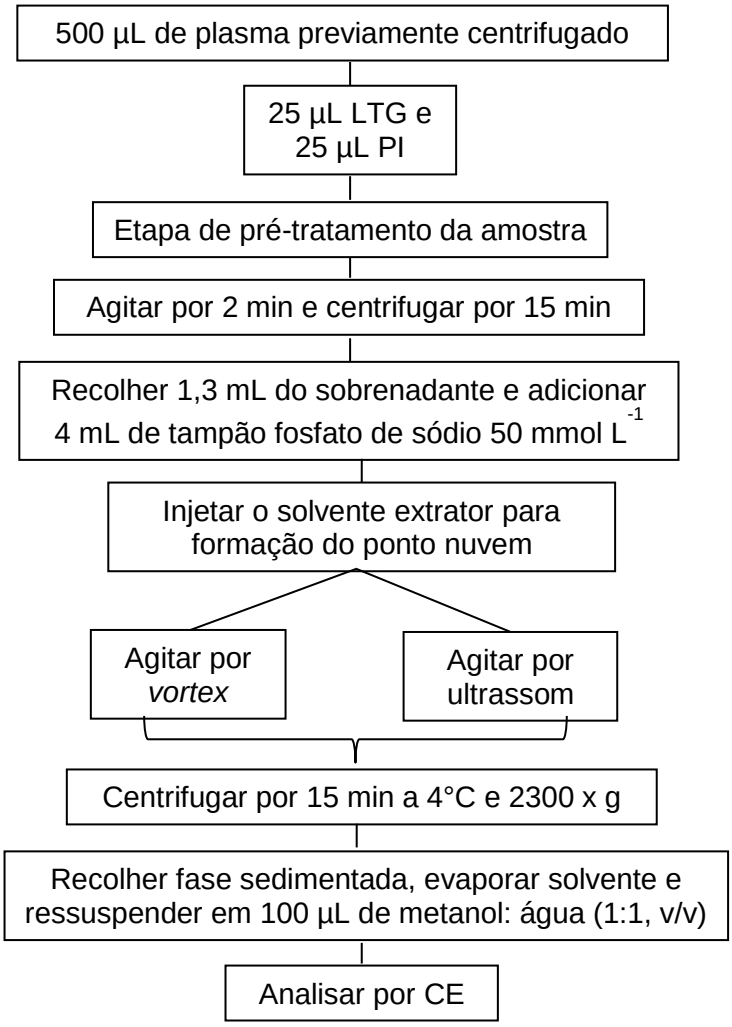

Figura 7 - Fluxograma referente ao desenvolvimento da DLLME para análise da LTG por CE

3.12 Validação do método analítico

A validação de um método analítico é essencial para avaliar a habilidade desse método em gerar resultados confiáveis, satisfatoriamente interpretáveis, que possam ser empregados na rotina (ROZET et al., 2011).

Após a avaliação dos parâmetros para extração da LTG por HF-LPME e DLLME, foi realizada a validação para ambos os métodos desenvolvidos contemplando os seguintes parâmetros: linearidade (curva analítica), limite de quantificação, seletividade, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade (congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração e pós-processamento) (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

3.12.1 Linearidade

A linearidade corresponde a resposta do equipamento em relação à concentração do analito na amostra em estudo (ANVISA, 2012). A curva analítica referente à linearidade foi avaliada fortificando-se alíquotas de 500 µL de plasma branco (n=3) com soluções padrão do PI (concentração plasmática de 5 µg mL^{-1}) e da LTG nas concentrações plasmáticas de 1 (LIQ, limite inferior de quantificação); 2 (CQB, controle de qualidade de concentração baixa); 4; 8; 10 (CQM, controle de qualidade de concentração média); 15 (CQA, controle de qualidade de concentração alta) e 20 µg mL^{-1} (LSQ, limite superior de quantificação). Após isto, as amostras foram submetidas aos procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7.

A curva analítica foi construída com os valores de concentração plasmática no eixo das abcissas e a razão entre a área da LTG e do PI no eixo das ordenadas. Foi feita a análise estatística dos dados através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficente de correlação. A adequação do modelo foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, com os cálculos dos valores de F e *p* para a LTG, para um nível de confiança de 95%. Os cálculos estatísticos foram realizados no progama MINITAB Release versão 14.1.

3.12.2 Precisão, exatidão e LIQ

A precisão é definida como a proximidade de resultados obtidos repetidamente e é expressa pelo coeficiente de variação (CV%). A exatidão é definida como a concordância de um resultado obtido com o valor de referência e é expressa pelo erro padrão relativo (EPR%).

O LIQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão com desvios abaixo de 20% (ANVISA, 2012).

A precisão e exatidão intracorridas (n=5) foram determinadas em um mesmo dia após fortificar 500 µL de plasma branco nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA de LTG e 5 µg mL^{-1} do PI. A precisão e exatidão intercorridas foram determinadas em 3 dias consecutivos fortificando-se plasma branco (n=5) nas mesmas concentrações citadas acima. As amostras foram submetidas aos procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7 e o CV% e o EPR% foram calculados de acordo com as equações 4 e 5.

(equação 4) $$CV = \left(\frac{desvio\ padrão}{concentração\ média\ experimental}\right) * 100$$

(equação 5) $$EPR = \left(\frac{concentração\ média\ experimental - concentração\ nominal}{concentração\ nominal}\right) * 100$$

3.12.3 Seletividade

A seletividade é o parâmetro que certifica que o método é capaz de diferenciar o analito e o PI em questão na presença de outros compostos endógenos (ANVISA, 2012). A seletividade foi avaliada pela análise de seis fontes diferentes de plasma branco, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, após a realização dos procedimentos de extração propostos.

Além disso, também foram avaliados como interferentes outros fármacos possivelmente coadministrados aos pacientes como carbamazepina, oxicarbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, primidona, venlafaxina, topiramato, diclofenaco, paracetamol, fluoxetina, diazepam, fenobarbital, levetiracetam, ácido fólico, omeprazol, citalopram, ibuprofen e captopril. Para isto, 25 µL de solução metanólica de cada um destes fármacos foram transferidos, separadamente, para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi ressuspenso em 100 µL de uma solução de metanol:água (1:1, v/v) e realizada a análise eletroforética nas condições estabelecidas para análise da LTG. Entretanto, se após a análise por CE, algum dos fármacos descritos acima apresentasse tempo de migração igual ou muito próximo ao da LTG ou PI, amostras de plasma branco contendo estes fármacos interferentes seriam submetidas aos procedimentos de extração conforme descrito nas Figuras 6 e 7 e, novamente realizada a análise eletroforética destas amostras extraídas e os tempos de migração comparados.

3.12.4 Efeito residual

O efeito residual é observado quando há o aparecimento ou aumento do sinal do analito, ou do PI, causado por contaminação de amostra analisada previamente (ANVISA, 2012).

Assim, o efeito residual foi avaliado pela análise de três amostras de plasma branco e uma amostra de plasma correspondente ao LSQ, submetidas aos procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7. Após a extração foi realizada a análise eletroforética da amostra de plasma branco, seguida pela análise da amostra correspondente ao LSQ e de duas amostras de plasma branco.

3.12.5 Estabilidade

O teste da estabilidade é realizado para certificar que o preparo, a análise e o armazenamento da amostra não afetam a concentração do analito investigado. A estabilidade foi realizada fortificando-se 500 µL de plasma com LTG nas concentrações plasmáticas do CQB e CQA (n=5) e submetidas às diferentes condições avaliadas no teste. No momento do procedimento de preparo da amostra por HF-LPME ou DLLME o PI, na concentração plasmática de 5 µg mL^{-1}, foi adicionado na amostra. As condições avaliadas foram:

- Estabilidade pós-processamento (auto injetor): as amostras de plasma foram fortificadas com LTG e submetidas aos procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7 e somente depois de 20 horas foram analisadas. Esse tempo compreende o intervalo entre o término de preparo das amostras em estudo e o fim da corrida eletroforética.
- Estabilidade de curta duração: as amostras de plasma foram fortificadas com LTG e mantidas à temperatura ambiente por tempo superior ao que as amostras em estudo foram submetidas durante o procedimento de extração (4 horas) e em seguida foram realizados os procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7 e as amostras analisadas por CE.
- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras de plasma fortificadas com LTG foram congeladas a -20°C por 12 horas e depois descongeladas à temperatura ambiente, e congeladas novamente. Depois de 3 ciclos as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito nas Figuras 6 e 7 e analisadas por CE. O número de ciclos de congelamento e descongelamento é determinado de acordo com o número de ciclos as quais serão submetidas as amostras em estudo.

- Estabilidade de longa duração: as amostras de plasma fortificadas com LTG foram armazenadas a -20°C por 36 dias e então submetidas aos procedimentos de extração descritos nas Figuras 6 e 7 e analisadas por CE. Esse tempo excede o intervalo de tempo em que a amostra dos pacientes ficou armazenada para posterior análise.

Todas as amostras submetidas ao teste de estabilidade (n=5) foram quantificadas com o auxílio de uma curva analítica no intervalo de concentração plasmática de 1 – 20 µg mL^{-1}, e foram calculados o CV% e o EPR%.

A estabilidade da LTG em solução metanólica foi avaliada juntamente com o PI, em triplicata. Foram empregadas amostras recém preparadas e amostras preparadas há cinco meses, nas concentrações de LTG equivalentes ao CQB e CQA, e o PI, foi empregado na concentração de 5 µg mL^{-1}. Assim, 25 µL da solução padrão de LTG e 25 µL da solução padrão do PI, nas condições acima citadas (recém preparadas e armazenadas há cinco meses), foram transferidos para tubos de extração, evaporados sob fluxo de ar comprimido, ressuspendidos em 100 µL de uma solução de metanol:água (1:1, v/v) e realizada a análise eletroforética. Para quantificação destas amostras foi utilizada uma curva analítica, recém preparada, nas concentrações metanólicas de 20, 40, 80, 160, 200, 300 e 400 µg mL^{-1}. O CV% e o EPR% foram calculados.

3.13 Cálculo da recuperação

A recuperação da LTG foi determinada pela razão da área obtida por amostras de plasma fortificadas com a LTG antes da extração e a área obtida de amostras de plasma fortificadas depois da extração, com a mesma concentração de LTG. As amostras de plasma fortificadas após a extração foram consideradas como 100% de recuperação e a recuperação das amostras de plasma fortificadas antes da extração foram determinadas.

3.14 Aplicação do método

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em amostras de plasma de pacientes em tratamento com a LTG e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP.

3.15 Comparação dos métodos

A análise estatística dos dados foi realizada empregando o software GraphPad Prism 5 versão 5.01. Foi calculado o valor de *p* para a LTG.

Resultados e Discussão

"Leve na sua memória para o resto da sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades... elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo."

(Chico Xavier)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das condições para análise da LTG por CE

A análise eletroforética da LTG foi realizada juntamente com o PI lidocaína. E com o intuito de alcançar os valores mais adequados de tempo de migração, eficiência do pico e fator de assimetria, vários parâmetros foram avaliados. Dentre eles estão:

- Composição do BGE (tampão acetato de sódio e MES);
- Concentração do BGE (90, 110 e 130 mmol L^{-1});
- pH do BGE (3, 4 e 5);
- Temperatura da análise (15 – 30°C);
- Tensão aplicada (15 – 30 kV);
- Tempo de injeção da amostra (5,10 e 15 segundos);
- Pré-concentração *online* da amostra (*stacking* mediado por força iônica);
- Depleção do BGE.

4.1.1 Condicionamento do capilar

O capilar utlizado nas análises eletroforéticas é constituído de sílica fundida. Assim, procedimentos de lavagem e condicionamento são necessários para manter a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que esta é altamente dependente da natureza da sílica e varia de acordo com os lotes e fabricantes dos capilares (MAYER, 2001). Esse condicionamento geralmente é realizado, no primeiro uso, com solução de NaOH 1 mol L^{-1} e é essencial na ionização dos grupos silanóis livres (WEINBERGER, 2000).

O condicionamento do capilar, com NaOH, entre as corridas é importante para garantir que a superfície do capilar fique totalmente carregada (WEINBERGER, 2000). Essa lavagem é importante para a separação dos componentes da amostra e repetibilidade dos resultados, pois permite que o capilar retorne às suas condições iniciais de análise, e diminua a variação no tempo de migração devido à variação do fluxo eletrosmótico (EOF do inglês, *eletrosmotic flow*). Além disso, esse passo é imprescindível quando há o emprego de amostras biológicas como plasma, soro e

urina devido a possível adsorção de material biológico na parede do capilar (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013). Desse modo, em métodos bioanalíticos, solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} ou 1 mol L^{-1} é comumente utilizada para remoção do material adsorvido na parede do capilar, seguida da lavagem com água e por fim com o BGE para reequilibrar a parede do capilar (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013). A Tabela 2 descreve o condicionamento do capilar em diferentes momentos do seu uso.

Tabela 2 - Condicionamento do capilar

Condicionamento	Lavagens	Tempo
Primeiro uso do capilar	Solução de NaOH 1 mol L^{-1}	1 hora
	Água ultrapura	1 hora
Condicionamento no início e final do dia	Solução de NaOH 1 mol L^{-1}	20 minutos
	Água ultrapura	20 minutos
Condicionamento entre as análises	Solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}	2 minutos
	Água ultrapura	2 minutos
	BGE	3,5 minutos

4.1.2 Composição, concentração e pH do BGE

Para a avaliação do BGE é primordial levar em consideração as propriedades físico-químicas do analito em estudo. Como mencionado anteriormente, a LTG é uma base fraca (pKa 5,7) (Food and Drug Administration, 2005). Em análises eletroforéticas em meio aquoso, como na eletroforese capilar em solução livre, a separação acontece devido a mobilidade de compostos ionizados (ALTRIA, 1996). Assim, no caso da LTG, o BGE deve estar em pH ácido para que ela fique na sua forma ionizada (Figura 8). Além disso, a composição, o pH, a concentração, a capacidade tamponante e a condutividade do BGE também devem ser levados em consideração (REIJENGA et al., 1996). O tipo do eletrólito pode melhorar a eficiência e seletividade do método enquanto que o pH do BGE é o maior responsável pela seletividade. Em relação à concentração, esta exerce forte influência no EOF, na mobilidade eletroforética, eficiência, resolução e seletividade

do método, além disso, a capacidade tamponante do BGE é de suma importância para que o pH da solução permaneça constante durante as análises (KUHN; HOFFSETTER-KUHN, 1993).

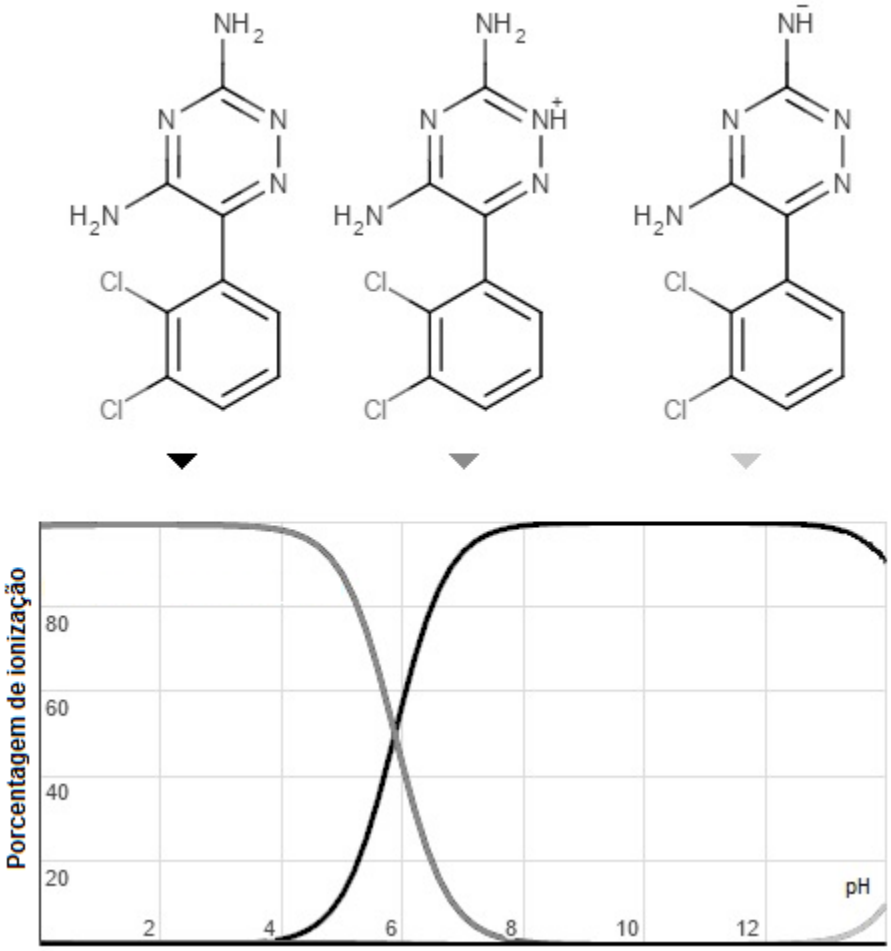

Figura 8 - Ionização da LTG em diferentes valores de pH (adaptado de <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=lamotrigine&source=fp>)

- *Composição do BGE*

Foram avaliadas duas soluções de eletrólitos compostas por acetato de sódio nas concentrações de 80, 100, 110 e 130 mmol L^{-1} e MES nas concentrações de 90, 110 e 130 mmol L^{-1}. Em relação à solução de acetato de sódio, a banda eletroforética correspondente à LTG apresentou um pronunciado alargamento de banda, com valores do fator de assimetria acima do aceitável (0,9 – 1,2) (DOLAN, 2002). Além disso, a corrente elétrica gerada foi muito elevada, o que impossibilitava a aplicação de altas tensões. Assim, foi avaliado como BGE a solução de MES, que é um sal orgânico e, por isso gera menor corrente elétrica quando comparado ao tampão composto por sais inorgânicos (STEINER; FRITZ, 2008). Assim, com o uso

do MES foi possível a aplicação de maiores valores de tensão. Além disso, o uso do MES proporcionou picos mais simétricos e, desse modo o MES foi selecionado como BGE.

Para o início da avaliação dos parâmetros, seu pH foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1 mol L^{-1}. As análises foram realizadas na tensão de 30kV, 20°C de temperatura e injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi. As dimensões do capilar de sílica fundida foram 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo.

- *Concentração do BGE*

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração do MES em relação ao tempo de migração, eficiência e fator de assimetria para a LTG. Pode ser observado que à medida que a concentração do BGE aumentou, houve um aumento no tempo de migração (Figura 9A) e eficiência, e diminuição no fator de assimetria (Figura 9B).

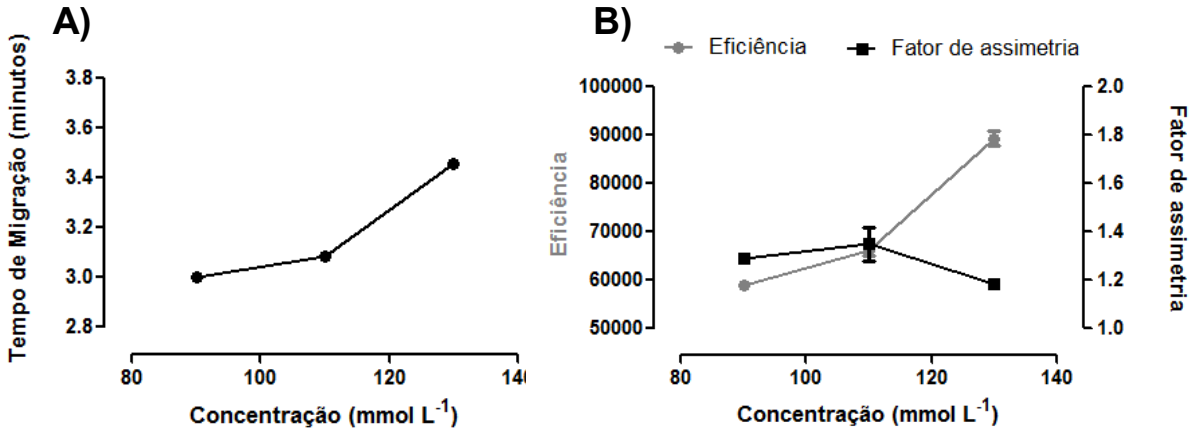

Figura 9 - Influência da concentração do BGE no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES pH 5, 30 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi

Em relação ao tempo de migração, este aumento ocorreu devido à diminuição do potencial zeta e consequente diminuição do EOF. Além disso, o aumento na concentração do BGE aumenta a viscosidade do meio e aumenta a densidade de cargas com consequente compressão da dupla camada elétrica. Assim, a LTG que se encontra com carga positiva em valores mais baixos de pH, é circundada por

contraíons que tem maior atração pelo polo de injeção (anodo) gerando resistência na migração do cátion em direção ao detector. (WEINBERGER, 2000).

A melhora na eficiência pode ter ocorrido pelo aumento na condutividade do BGE, devido ao aumento de sua concentração, favorecendo o *stacking* da amostra uma vez que esta foi dissolvida em solução composta por metanol:água (1:1, v/v) (WEINBERGER, 2000). O *stacking* ocorre quando a amostra é injetada em um meio de menor condutividade que o BGE e, portanto, favorece o empilhamento da mesma com consequente aumento na eficiência (ALTRIA, 1996). Detalhes sobre o mecanismo de *stacking* será descrito no item 4.1.6.

- *pH do BGE*

O pH do BGE é de fundamental importância em CE, pois ele é responsável pela intensidade do EOF e influencia na mobilidade dos compostos ionizáveis (KUHN; HOFFSETTER-KUHN, 1993). A sua variação deve ser de acordo com a ionização do analito de interesse. Assim, para assegurar a total ionização do analito, o valor do pH deve estar uma unidade abaixo do pKa do mesmo (ALTRIA, 1996). Com o objetivo de manter o analito ionizado, foram avaliados os valores de pH de 3, 4 e 5, todos abaixo do pKa do analito (5,7) (Figura 8).

Pode ser observado pela Figura 10B que, no valor de pH 3, houve aumento no fator de assimetria, provavelmente devido ao baixo EOF e difusão longitudinal do analito (WEINBERGER, 2000). Porém, à medida que o pH aumentou, o fator de assimetria (Figura 10B), bem como o tempo de migração (Figura 10A) diminuíram, e a eficiência aumentou (Figura 10B). Esses parâmetros são amplamente influenciados pela extensão do EOF: em valores de pH mais elevados os grupos silanóis encontram-se mais ionizados o que gera maior potencial zeta com consequente aumento do EOF (WEINBERGER, 2000). A velocidade eletroforética do analito somada à velocidade do EOF faz com que as espécies migrem mais rapidamente e uniformemente, resultando em bandas mais simétricas, eficientes e em menor tempo. Assim, o pH 5 foi selecionado para as análises posteriores.

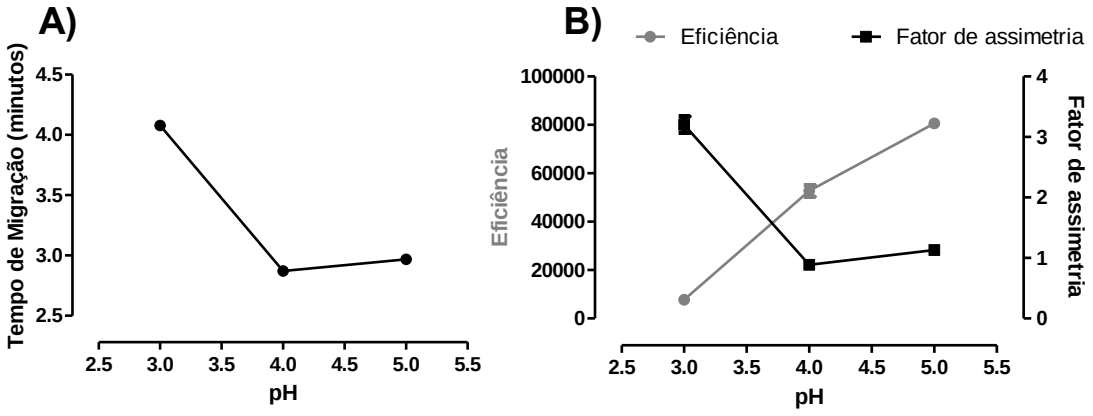

Figura 10 - Influência do pH do BGE no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1}, 30 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi

4.1.3 Efeito da tensão aplicada

O alargamento de banda em CE pode ser ocasionado pela dispersão longitudinal, efeito Joule, interação secundária do analito com os grupos silanóis residuais da parede do capilar e fatores de injeção e detecção (WEINBERGER, 2000). O efeito da dispersão longitudinal pode ser resolvido com o emprego de tensões mais elevadas, com consequente melhora no fator de assimetria do pico e aumento na eficiência (WEINBERGER, 2000). Sendo assim, para análise da LTG foram avaliados os valores de tensão de 15, 20, 25 e 30 kV (Figura 11).

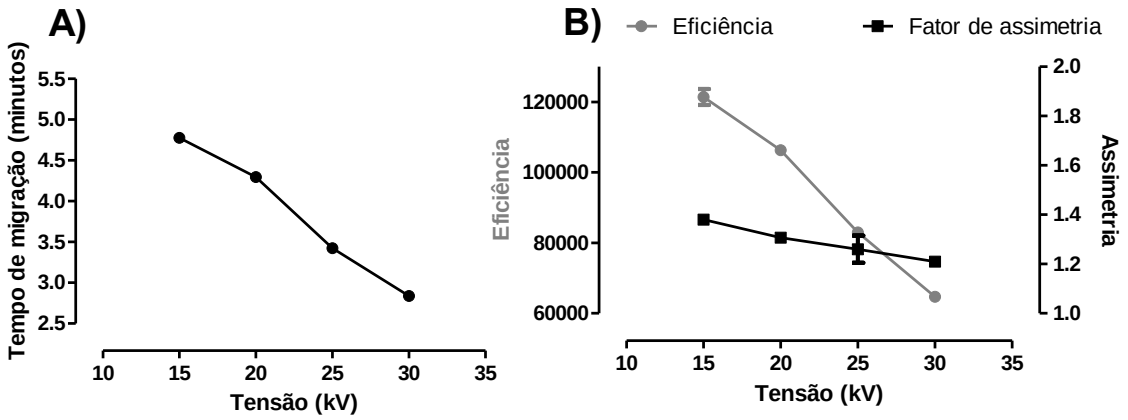

Figura 11 - Influência da tensão aplicada no tempo de migração (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 20°C, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi

Pode ser observado pelo gráfico da Figura 11A que, à medida que os valores de tensão aumentaram, houve diminuição no tempo de migração da LTG. A velocidade de migração dos íons na solução é altamente influenciada pelo campo elétrico gerado através do capilar, que por sua vez é resultante da tensão aplicada. Uma vez que as velocidades de migração dos analitos e do EOF são diretamente proporcionais à tensão aplicada (equações 6 e 7), quando há o aumento da tensão, há a diminuição do tempo de migração (KUHN; HOFFSETTER-KUHN, 1993). A diminuição no valor do fator de assimetria pode ter ocorrido devido a diminuição da dispersão longitudinal. Entretanto, foi observado diminuição da eficiência (Figura 11B). que pode ter ocorrido devido ao efeito Joule, pois em altas tensões a passagem de corrente elétrica pelo BGE leva a geração de calor devido à colisão entre as moléculas presentes no meio. Esse aumento na temperatura é conhecido como efeito Joule que é responsável pela perda de eficiência devido à formação de gradientes de temperatura no interior do capilar quando não há dissipação eficiente do calor gerado (WEINBERGER, 2000). Assim, para manter o compromisso entre tempo de migração e eficiência, a tensão de 15 kV foi selecionada.

$$v = \mu_e E \qquad \text{(equação 6)}$$

Onde: v = velocidade eletroforética, μ_e = mobilidade eletroforética e E = campo elétrico aplicado (Volts/cm)

$$V_{EOF} = -\frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E \qquad \text{(equação 7)}$$

Onde: V_{EOF} = velocidade eletrosmótica, ε = constante dielétrica, ζ = potencial zeta, η = viscosidade do meio e E = campo elétrico aplicado

4.1.4 Efeito da temperatura

Para a otimização desse parâmetro, foram avaliadas as temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C. Pode ser observado, pela Figura 12 que, à medida que a temperatura de análise aumentou, houve diminuição no tempo de migração e na eficiência, e aumento da área do pico. Isto acontece porque a viscosidade do meio e a mobilidade eletroforética das espécies são influenciadas pela variação da temperatura. Uma vez que a temperatura aumentou, a viscosidade do meio diminuiu e ele se tornou mais fluido, o que facilitou a movimentação das espécies (ALTRIA, 1996) com consequente diminuição do tempo de migração (Figura 12A). Além disso,

o aumento da temperatura também proporcionou aumento da área do pico (Figura 12B), uma vez que a quantidade de amostra que entra no capilar é influenciada pela viscosidade quando a injeção é hidrodinâmica (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013). Em relação à eficiência, esta apresentou queda acentuada quando a temperatura de análise aumentou (Figura 12B). Isso pode ter acontecido por causa da maior quantidade de massa que foi injetada no capilar devido à diminuição da viscosidade, o que pode causar um excesso de amostra no capilar, ou também pela ineficiência do capilar em dissipar o calor gerado provocando o efeito Joule (WEINBERGER, 2000; ALTRIA, 1996). Assim, para manter o compromisso entre tempo de migração e eficiência, a temperatura de 20 °C foi selecionada.

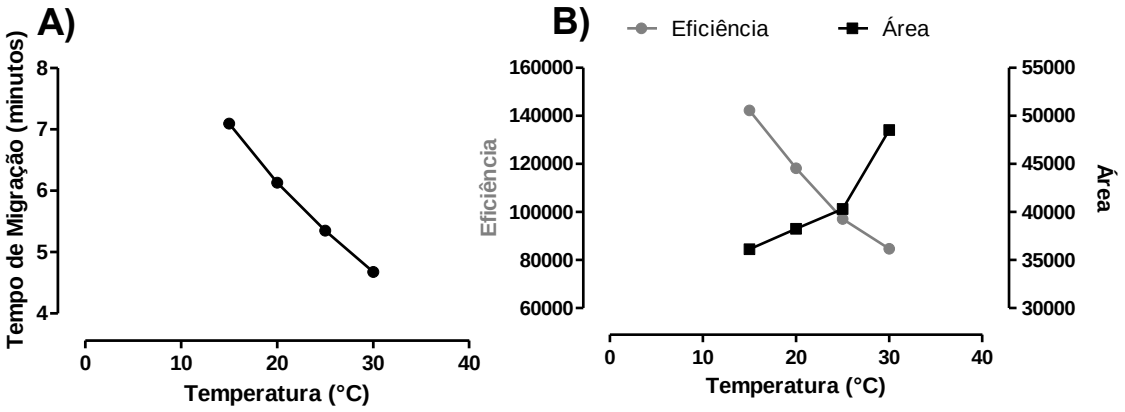

Figura 12 - Influência da temperatura no tempo de migração (A), eficiência e área (B). Condições eletroforéticas: capilar com 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, injeção hidrodinâmica por 15 segundos a 0,5 psi

4.1.5 Efeito do tempo de injeção da amostra

Segundo Mayer (2001) e Ali, Aboul-Enein e Gupta (2006) devido a injeção hidrodinâmica geralmente ser afetada somente pela variação da temperatura e viscosidade do BGE, esta é mais precisa e robusta em relação à injeção eletrocinética, a qual é dependente do EOF e da mobilidade eletroforética dos compostos em análise. Na injeção hidrodinâmica, o valor da área/altura obtido após injeção da amostra é proporcional ao volume da amostra do analito que foi injetado, o qual depende do tempo em que foi aplicada a pressão para que ocorra a entrada da amostra no capilar (KUBÁÑ; SEIMAN; KALJURAND, 2013). Assim, a

repetibilidade do método é altamente dependente do tempo de injeção da amostra. Isso se deve ao fato de que apenas poucos nanolitros da amostra são introduzidos no capilar, assim, a mínima variação que ocorre pode resultar na perda de repetibilidade dos resultados (ALI; ABOUL-ENEIN; GUPTA, 2006). Para a análise deste parâmetro, a LTG foi injetada hidrodinamicamente (0,5 psi) e foram avaliados os tempos de injeção de 5, 10 e 15 segundos.

A pressão aplicada por 5 segundos (Figura 13A) permitiu que uma pequena quantidade de amostra fosse injetada no capilar, consequentemente isto resultou em um pico com menor área, o que pode prejudicar a sua detectabilidade em concentrações menores. A injeção por 15 segundos proporcionou grande quantidade de massa injetada, acarretando perda de eficiência e aumento no fator de assimetria devido ao excesso de massa introduzida no capilar (Figura 13B). Sendo assim, o tempo selecionado para injeção da amostra foi de 10 segundos, o qual proporcionou valores adequados de área (Figura 13A), eficiência e fator de assimetria (Figura 13B).

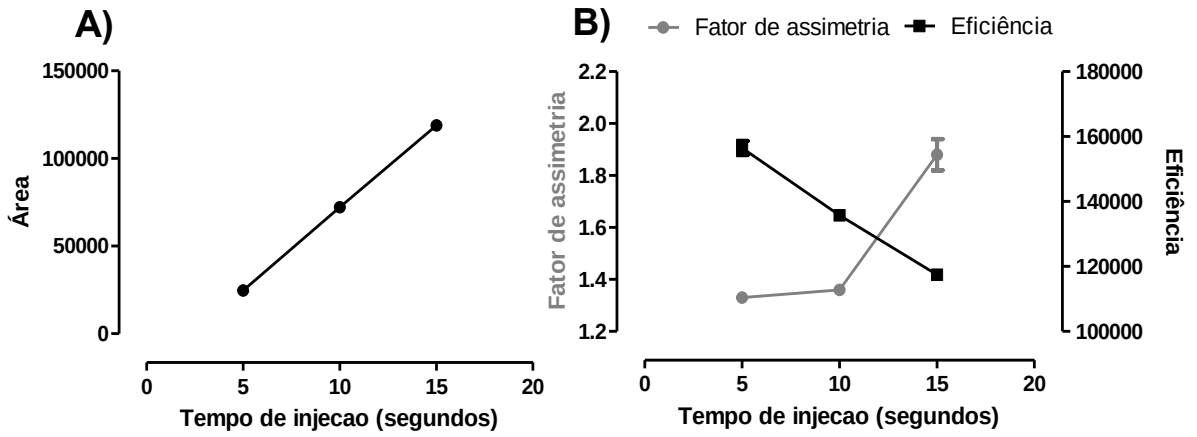

Figura 13 - Influência do tempo de injeção da amostra na área da LTG (A), eficiência e fator de assimetria (B). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, 20°C

4.1.6 Pré-concentração *online* – *Stacking* mediado por força iônica

Em CE a quantidade de analito a ser detectada é menor devido à pequena quantidade de amostra injetada (da ordem de nanolitros) e ao reduzido caminho óptico proporcionado por dimensões reduzidas do capilar (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013). Sendo assim, é recomendado a mínima dispersão da amostra no

capilar (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013). O uso de técnicas de pré-concentração *online* proporciona melhora na razão sinal/ruído com consequente melhora da detectabilidade. O *stacking* mediado por força iônica pode ser alcançado quando há mudança de condutividade no meio eletroforético, o que gera alterações no campo elétrico. Isso resulta em mudança na velocidade eletroforética do analito nos diferentes meios proporcionando a obtenção de bandas mais finas (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013).

No *stacking* mediado por força iônica a amostra é preparada em solução de menor condutividade quando comparada ao BGE. Quando a tensão é aplicada, a força do campo elétrico será maior na região de menor condutividade (região de maior resistividade). Como consequência, as espécies carregadas presentes nesta região se moverão mais rapidamente e quando alcançam a interface entre a banda da amostra e a banda do BGE são desaceleradas, causando uma redução no comprimento da banda da amostra (DE MORAES et al., 2009). Isto faz com que ocorra um empilhamento da solução de amostra, conhecido como *stacking*, durante os segundos iniciais da separação. Este empilhamento possibilita a introdução de volume maior de amostra no capilar sem que haja perda da eficiência (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013).

A avaliação do *stacking* foi realizada levando em consideração a eficiência do pico da LTG, uma vez que as amostras foram ressuspendidas em diferentes soluções como MES, água ultrapura, metanol ou solução de água:metanol (1:1, v/v).

O uso do MES ocasionou alargamento total do pico com perda de eficiência. Isso ocorreu porque a zona de injeção da amostra e o BGE apresentam a mesma força iônica, condutividade e resistividade à passagem de corrente (WEINBERGER, 2000; DE MORAES et al., 2009). A ressuspensão da LTG em água, metanol ou na mistura água:metanol (1:1, v/v) proporcionaram maior eficiência dos picos devido à diferença na condutividade entre as bandas, com consequente empilhamento dos íons. Assim, de acordo com o gráfico da Figura 14, a solução composta por metanol:água (1:1, v/v) foi selecionada para a ressuspensão da amostra.

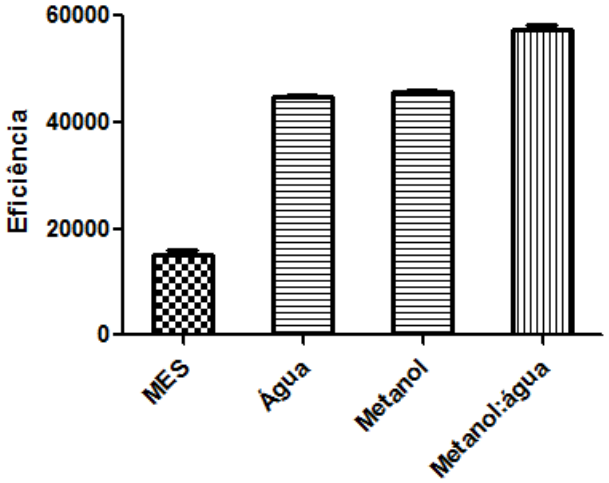

Figura 14 - Influência do s*tacking* da amostra em diferentes meios de ressuspensão. O eixo x representa a ressuspensão da amostra em 1) MES, 2) água, 3) metanol e 4) solução de metanol:água (1:1, v/v). Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, MES 130 mmol L^{-1} pH 5, 15 kV, 20°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 0,5 psi

4.1.7 Condições estabelecidas

Após a avaliação de vários parâmetros que podem influenciar na análise eletroforética, foram selecionadas as condições descritas na Tabela 3. A Figura 15 representa um eletroferograma com as a separação da LTG e do padrão interno (PI) lidocaína.

Tabela 3 - Condições estabelecidas para análise da LTG

Parâmetro	Condição otimizada
Capilar	Sílica fundida, 75 µm de diâmetro interno, 50 cm de comprimento efetivo
Injeção	Hidrodinâmica por 10 segundos e 0,5 psi
BGE	MES
Concentração do BGE	130 mmol L^{-1}
pH	5
Tensão	15 kV
Corrente	6,5 µA
Temperatura	20°C
Ressuspensão da amostra	metanol:água (1:1, v/v)

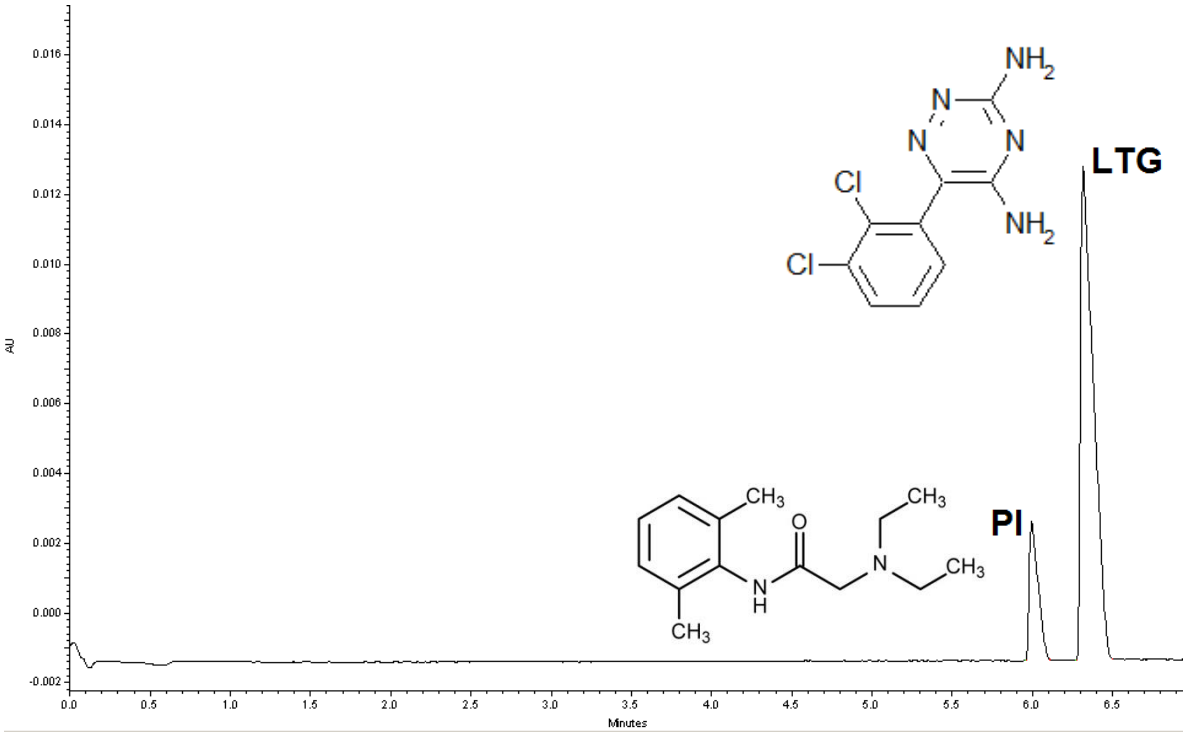

Figura 15 – Eletroferograma referente as condições estabelecidas para análise da LTG e do PI.

4.1.8 Depleção do BGE

Devido à constante aplicação de altas tensões durante as análises, o BGE pode sofrer alterações tanto na sua composição quanto no seu pH, fenômeno denominado eletrólise ou depleção do BGE, o que compromete a repetibilidade das análises. Em soluções aquosas a eletrólise da água gera o acúmulo de prótons no anodo, o que torna a solução no reservatório mais ácida, e no catodo ocorre o acúmulo de íons hidróxidos, o que torna a solução no reservatório mais alcalina (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013). Quando uma diferença de potencial é aplicada, há migração destas espécies para os eletrodos de carga oposta gerando gradiente de pH no interior do capilar. Essa depleção do BGE tem impacto direto na ionização das espécies e na magnitude do EOF, com comprometimento da área, tempo de migração, resolução e eficiência dos picos (TAGLIARO et al., 1998). A principal causa da eletrólise é a falta de capacidade tamponante do BGE, por isso a escolha de um sistema tamponante forte é de suma importância para manutenção das características da solução por tempo prolongado, juntamente com o valor adequado de pH. Assim, altas concentrações do BGE exercem influência na

eletrólise, reduzindo a probabilidade de sua ocorrência (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013).

Outros fatores que podem ocasionar a eletrólise são volume insuficiente da solução tampão nos *vials*, temperatura, corrente gerada e o tempo em que é aplicada a tensão (MAYER, 2001). Devido a todos esses riscos relacionados à alteração da composição do BGE, para evitar a depleção é aconselhável limitar o número de corridas realizadas usando a mesma solução de BGE nos reservatórios (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO, 2013). Também deve ser realizado o teste de eletrólise, no qual é avaliado o número máximo de vezes em que a amostra pode ser injetada com a mesma solução de BGE nos reservatórios. A avaliação da depleção do tampão foi feita pela análise de 15 injeções consecutivas usando a mesma solução de BGE (tampão MES, pH 5, na concentração de 130 mmol L^{-1} e tensão de 15 kV) nos reservatórios. O coeficiente de variação para o tempo de migração foi calculado e ficou abaixo de 1 %, o que é considerado adequado para análises por CE (MAYER, 2001). Portanto, a solução dos reservatórios do *inlet* e *outlet* foi trocada após a realização de 15 análises eletroforéticas.

4.2 Avaliação da HF-LPME para análise da LTG em plasma

Após a otimização das condições eletroforéticas, a HF-LPME foi avaliada no modo de 3 fases. Para alcançar os melhores valores de recuperação do analito de interesse, vários parâmetros foram estudados:

- Solvente orgânico (dibutil éter, 1-octanol, acetato de hexila, acetato de dodecila, acetato de butila, N,N-dimetilformamida e n-hexil etér);
- Tempo de extração (5, 15, 30, 50 e 70 minutos);
- Velocidade de agitação da amostra (500, 1000 e 1500 rpm);
- pH da fase doadora (5 – 10);
- pH da fase aceptora (1 – 4);
- Efeito s*alting out* (0, 2, 5 e 7%).

A fase aquosa foi composta por 500 µL de plasma branco adicionado da LTG e PI, e 3,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} para manter o pH da amostra constante.

4.2.1 Efeito do solvente orgânico na fibra

O solvente orgânico se encontra imobilizado nos poros da fibra. Ele age como uma barreira, entre a fase doadora e a fase aceptora, que o analito precisa atravessar para ser extraído (CHA; MYUNG, 2013). Para isso, é necessário que esse solvente orgânico possua características importantes como: ter baixa volatilidade para evitar sua perda durante o processo de extração, ser possível sua imobilização nos poros da fibra, ter baixa solubilidade em água (EBRAHIMZADEH et al., 2010), alta solubilidade com os analitos de interesse (CHA; MYUNG, 2013) e apresentar moderada viscosidade para evitar a sua saída dos poros da fibra (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011). Seguindo esses conceitos, os solventes orgânicos testados foram o di-N-hexiléter, di-N-butiléter, 1-octanol, acetato de butila, N-dimetil-formamida, acetato de hexila e acetato de dodecila.

Como mostrado na Figura 16, somente com os solventes octanol e di-N-butiléter foi possível obter a extração da LTG da amostra de plasma. O octanol apresentou maior recuperação da LTG em relação ao di-N-butiléter e também maior *clean up* da amostra, sendo possível obter um eletroferograma livre de interferentes endógenos. Portanto, este foi o solvente selecionado para impregnação da fibra.

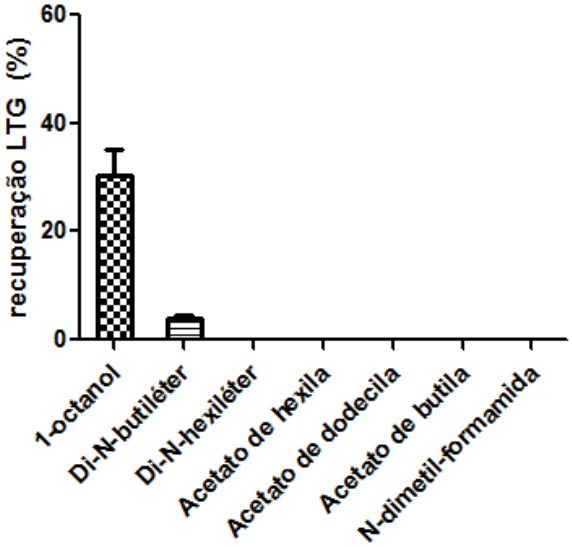

Figura 16 - Efeito do solvente orgânico na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 50 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0

4.2.2 Efeito do tempo de agitação

A HF-LPME é um processo de equilíbrio que depende da transferência de massa do analito da fase doadora para a fase aceptora contida no interior da fibra. A variação do tempo de agitação da amostra é essencial para avaliar esse processo de transferência de massa (BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE, 2003). Assim, a HF-LPME não é um método exaustivo de extração e a recuperação do analito é diretamente proporcional ao tempo de agitação da amostra até o momento em que o equilíbrio é atingido (EBRAHIMZADEH et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2008). O perfil de recuperação do analito foi avaliado nos tempos de 5, 15, 30, 50 e 70 minutos (Figura 17).

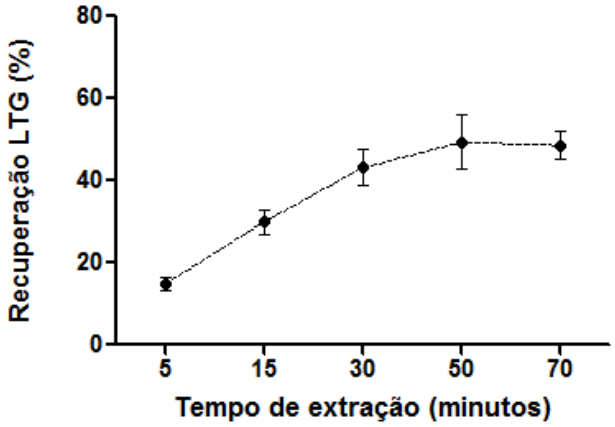

Figura 17 - Influência do tempo de agitação na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol.

Pode ser observado que houve aumento significativo na recuperação do analito até 30 minutos de extração, sendo que após esse tempo não houve diferença significativa. Assim, para manter o compromisso entre porcentagem de recuperação e tempo de agitação foi selecionado o tempo de 30 minutos de agitação da amostra. Embora o tempo de agitação seja considerado elevado em comparação com outros métodos de extração, várias amostras podem ser preparadas simultaneamente, o que minimiza o efeito deste longo tempo de agitação. Além disso, é relatado na literatura tempos de agitação relativamente longos para a esta extração, que variaram entre 30 e 50 minutos (CHA; MYUNG, 2013; SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011; CARRÃO et al., 2011; EBRAHIMZADEH et al., 2010; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007).

4.2.3 Efeito da velocidade de agitação da amostra

A velocidade de agitação da amostra é um dos parâmetros que afeta a cinética da extração. Ela facilita diretamente a transferência de massa e aumenta a difusão do analito para a camada orgânica dos poros e, consequentemente, reduz o tempo necessário para atingir o equilíbrio da extração (EBRAHIMZADEH et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2008; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007;). Entretanto, agitações muito vigorosas podem produzir bolhas de ar na superfície da fibra (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007) e também promover o deslocamento do solvente orgânico dos poros (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011), o que compromete a recuperação do analito. Assim, foram avaliadas as velocidades de agitação da amostra de 500, 1000 e 1500 rpm.

Pela Figura 18 pode ser observado que não houve diferença na recuperação da LTG entre as diferentes velocidades avaliadas. É possível que a condição de equilíbrio entre as fases tenha sido alcançada em valores mais baixos de agitação (EMÍDIO et al., 2010). Desoubries et al., (2012) explicaram este resultado atribuindo-o ao formato e tamanho reduzidos do tubo onde está a amostra (tubo de 6 mL) o que facilita a movimentação do analito e sua rápida transferência para o interior da fibra. Sendo assim, a velocidade de agitação selecionada foi de 500 rpm.

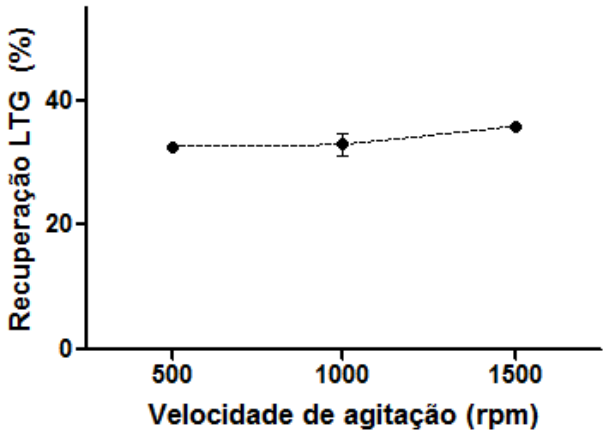

Figura 18 - Influênciada velocidade de agitação na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol

4.2.4 Efeito do pH da fase doadora

No preparo de amostras, o pH é essencial na eficiência da extração de compostos ácidos e básicos. No caso da HF-LPME o ajuste do pH da fase doadora resulta em uma maior razão de distribuição e garante altos valores de recuperação (DE OLIVEIRA et al., 2008). Dependendo do pKa do analito, o pH deve ser ajustado para que este permaneça em sua forma não ionizada e reduza sua solubilidade na fase doadora aquosa (EBRAHIMZADEH et al., 2010). Para uma base fraca, a alcalinização da amostra a mantém em sua forma não ionizada, o que reduz sua solubilidade em amostras aquosas e facilita a extração pelo solvente orgânico. (EBRAHIMZADEH et al., 2010; RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 2004; HALVORSEN et al., 2001). Como a LTG é uma base fraca (pKa 5,7), o pH da fase doadora foi avaliado pela adição de solução de fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} na faixa de pH de 5 a 10, para manter a LTG na sua forma não ionizada.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que altos valores de pH forneceram maiores valores de recuperação. Entretanto, acima de pH 9,0, não houve diferença significativa em relação à recuperação da LTG (Figura 19). Portanto, o pH 9 foi selecionado para a fase doadora.

Como mencionado anteriormente, o pH das fases deve ser otimizado para favorecer a extração dos analitos. No caso da fase aceptora, para uma base fraca, o pH deve ser mantido na região ácida para favorecer a ionização do analito e evitar que ele volte para a fase orgânica (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; HALVORSEN et al., 2001).

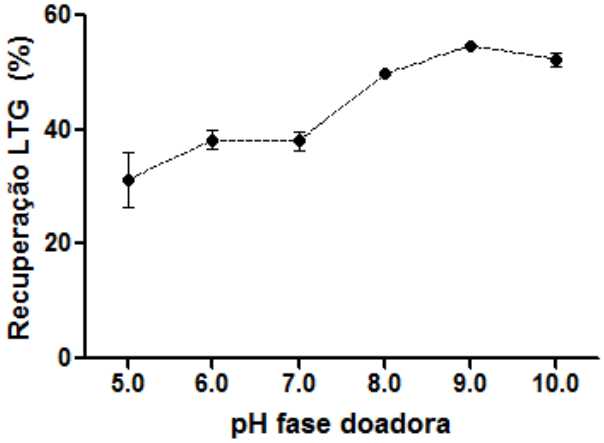

Figura 19 - Influência do pH da fase doadora na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} e fase aceptora ácido clorídrico pH 1,0. Solvente orgânico: 1-octanol

4.2.5 Efeito do pH da fase aceptora

Como a LTG é uma base fraca, esse parâmetro foi avaliado na faixa de pH ácido de 1 – 4, com o uso de ácido clorídrico em diferentes concentrações (0,5 – 0,01 mol L^{-1}). De acordo com a Figura 8, nessa faixa de pH a LTG está aproximadamente 100% na forma ionizada.

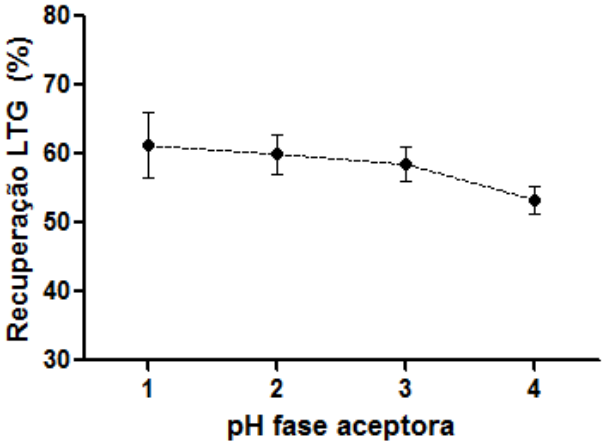

Figura 20 - Influênciado pH da fase aceptora na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 e fase aceptora ácido clorídrico. Solvente orgânico: 1-octanol

A Figura 20 mostra que não houve diferença significativa na porcentagem de recuperação da LTG nesses valores de pH. Entretanto, em valores de pH mais baixos altos valores de fator de assimetria foram observados. Isto pode ter acontecido devido à diferença de condutividade entre a banda da amostra e a do BGE (WEINBERGER, 2000). Assim, para manter o compromisso entre eficiência do pico e valores adequados de recuperação, o pH 4,0 foi selecionado.

4.2.6 Efeito *salting out*

O *salting out* consiste na saturação do meio aquoso por um sal. As moléculas de água da solução englobam as moléculas do sal dissociado, o que reduz a quantidade de água disponível para solvatar as moléculas do analito, fazendo com que o analito seja mais facilmente conduzido para a fase orgânica (LORD; PAWLISZYN, 2000).

O efeito *salting out* foi avaliado pela adição de cloreto de sódio na fase doadora nas concentrações de 0, 2, 5 e 7% (massa/volume). Os resultados

demonstraram que não houve melhoras na eficiência de extração da LTG após a adição do sal na fase doadora (Figura 21). Desse modo, os experimentos seguiram sem a adição de cloreto de sódio.

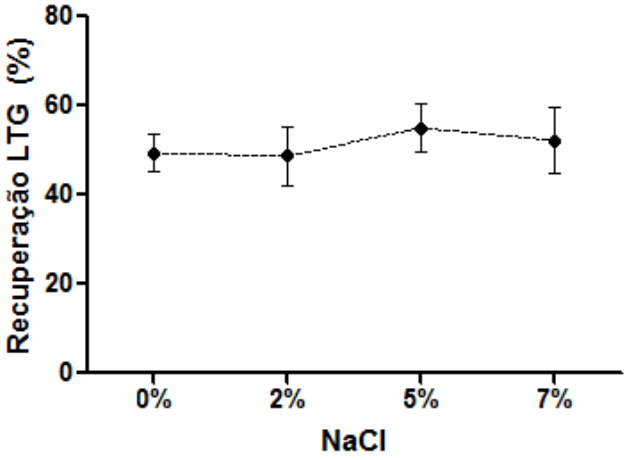

Figura 21 - Influência da adição de sal na extração da LTG por HF-LPME. A extração foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Fase doadora: 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 e fase aceptora ácido clorídrico pH 4. Solvente orgânico: 1-octanol

4.2.7 Condições estabelecidas para a HF-LPME

Após todos os parâmetros serem avaliados, as condições selecionadas para a extração da LTG em amostras de plasma por HF-LPME foram: fase doadora composta por 500 µL de plasma e 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. O solvente impregnado na fibra foi o 1-octanol e a impregnação foi feita por 15 segundos. A fase aceptora foi inserida no lúmen da fibra e composta por solução de ácido clorídrico pH 4,0 . A agitação foi realizada por 30 minutos a 500 rpm. Nestas condições foi possível obter uma porcentagem de recuperação de 54,3 %.

O eletroferograma de uma amostra de plasma branco fortificado com LTG e extraída pela HF-LPME nas condições otimizadas é mostrado na Figura 22A.

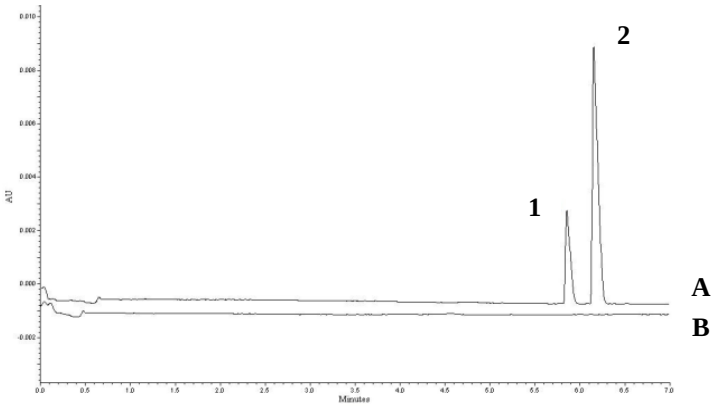

Figura 22 - Eletroferogramas da (A) amostra fortificada com LTG e extraída pela HF-LPME nas condições selecionadas. 1) PI e 2) LTG 10 µg mL^{-1} ; (B) amostra de plasma branco extraído por HF-LPME nas mesmas condições

4.3 Validação do método analítico

4.3.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada em triplicata fortificando-se alíquotas de 500 µL de plasma branco nas concentrações plasmáticas de 1; 2; 4; 8; 10; 15 e 20 µg mL^{-1}. O PI foi utilizado na concentração plasmática de 5 µg mL^{-1}. Após isso, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na Figura 6.

A correlação entre concentração e a razão entre a área da LTG e do PI foi feita por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para se obter a equação da reta e o coeficente de correlação (r). O coeficiente de correlação é um dos parâmetros utilizados para avaliar a adequação do ajuste da curva. Ele é definido pela razão da covariância entre a concentração X e o sinal analítico Y. A análise estatística dos dados foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, com os cálculos dos valores de F e *p* para a LTG, para um nível de confiança de 95%. O $F_{calculado}$ expressa a razão entre as variâncias obtidas na menor e maior concentrações. Esse valor tem que ser menor do que o $F_{tabelado}$, o que indica uma variância constante da curva analítica (CASSIANO et al., 2009).

Os dados da Tabela 4 mostram que o modelo linear de regressão está bem ajustado.

Tabela 4 - Linearidade do método para análise da LTG por HF-LPME

Faixa linear (µg mL^{-1})	Equação linear	r	ANOVA *Lack of fit*	
			F	*p*
1,0 – 20,0	y = 0,2953x – 0,0104	0,9967	0,51	0,795

r = coeficiente de correlação, $F_{Tabelado}$ = 2,445

4.3.2 Precisão, exatidão e LIQ

A precisão e exatidão foram realizadas em quintuplicata com a fortificação de 500 µL de plasma branco nas concentrações plasmáticas do LIQ, CQB, CQM e CQA (1; 2; 10; e 15 µg mL^{-1} respectivamente) da LTG e 5 µg mL^{-1} do PI.

As amostras foram extraídas conforme procedimento descrito na Figura 6 e o CV% e o EPR% foram calculados. A precisão e exatidão intracorridas (n=5) foram determinadas em um mesmo dia, e a precisão e exatidão intercorridas foram determinadas em 3 dias consecutivos e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Todos os valores estão abaixo dos preconizados pelos guias da Anvisa e EMA (abaixo de 20% para o LIQ e abaixo de 15% para o CQB, CQM e CQA).

Tabela 5 - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas[a] (n=5) do método para análise da LTG por HF-LPME

	Concentração nominal µg mL^{-1})	Concentração obtida µg mL^{-1})	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
LIQ	1,0	1,1	9,3	10,0
Intradia	1,0	1,1	7,7	10,0
	2,0	2,1	3,9	5,0
	10,0	9,5	2,4	-5,0
	15,0	15,6	4,5	4,0
Interdia[a]	1,0	1,01	4,7	10,0
	2,0	1,95	7,3	-5,0
	10,0	9,30	2,2	-7,0
	15,0	14,5	9,3	-3,3

[a], três dias consecutivos

4.3.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de 6 amostras de fontes diferentes de plasma branco, sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada. Além disso, também foram avaliadas amostras contendo outros fármacos possivelmente coadministrados aos pacientes. Para isso, foi realizada a análise eletroforética desses fármacos nas condições estabelecidas para análise da LTG. Nenhum dos fármacos avaliados apresentou tempo de migração igual ou próximo ao da LTG ou PI. O método foi seletivo e não apresentou nenhum sinal interferente no tempo de migração da LTG ou do PI. A Figura 22B apresenta um eletroferograma referente à análise de uma amostra de plasma branco extraído por HF-LPME.

4.3.4 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado pela análise de uma amostra de plasma branco, seguida pela análise de uma amostra fortificada na concentração do LSQ, e de duas amostras de plasma branco novamente. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração por HF-LPME e não foi observado efeito residual.

4.3.5 Estabilidade

O teste de estabilidade foi realizado fortificando-se 500 µL de plasma com LTG nas concentrações plasmáticas referente ao CQB e CQA (n=5). As condições avaliadas foram estabilidade de pós-processamento (20 horas após a realização do procedimento de extração), estabilidade de curta duração (as amostras fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente por 4 horas e depois extraídas e analisadas), estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos) e estabilidade de longa duração (as amostras foram fortificadas e armazenadas a -20°C por 36 dias e então extraídas e analisadas). Somente no momento da extração o PI foi adicionado à amostra. Todas as amostras submetidas ao teste de estabilidade foram quantificadas com o auxílio de uma curva analítica no intervalo de concentração plasmática de 1 – 20 µg mL^{-1} e calculados o CV% e o EPR%.Os testes mostraram que a LTG apresentou estabilidade nas condições de análise e armazenamento e valores adequados de precisão e exatidão abaixo de 15% como preconizado pelos guias da Anvisa e EMA (Tabela 6).

Tabela 6 - Estabilidade (n=5) do método para análise da LTG por HF-LPME

Estabilidade	Concentração nominal (µg mL^{-1})	Concentração obtida (µg mL^{-1})	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
Pós-processamento (20 horas)	2,0 15,0	1,8 13,5	5,2 12,9	-10,0 -10,0
Curta duração (4 horas)	2,0 15,0	2,1 12,9	6,6 1,4	5,0 -14,0
Congelamento e descongelamento (3 ciclos)	2,0 15,0	2,1 13,6	6,1 5,4	5,0 -9,3
Longa duração (36 dias)	2,0 15,0	2,2 16,4	3,1 5,3	10,0 9,3

A estabilidade da LTG em solução metanólica foi avaliada nas concentrações do CQB e CQA, e o PI, na concentração de 5 µg mL^{-1} (n=3) em soluções recém preparadas e soluções preparadas e armazenadas durante cinco meses. Após isto, 25 µL do padrão de cada solução acima citada foram transferidos para tubos de vidro, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e ressuspendidos em 100 µL de solução de metanol:água (1:1, v/v) e realizada a análise eletroforética.

Para quantificação das amostras foi utilizada uma curva analítica. O CV% e o EPR% foram calculados das amostras recém preparadas e de amostras preparadas e armazenadas há cinco meses. Como apresentado na Tabela 7, os testes mostraram que as soluções de LTG permaneceram estáveis com valores de CV% e o EPR% abaixo de 10% como preconizado pelo guia da Anvisa.

Tabela 7 - Estabilidade (n=3) da solução padrão da LTG

Estabilidade	Concentração nominal µg mL^{-1})	Concentração obtida µg mL^{-1})	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
Amostras recém preparadas	2,0 15,0	1,9 14,6	1,7 2,5	-5,0 -2,6
Amostras preparadas há 5 meses	2,0 15,0	1,8 14,3	3,4 4,3	-10,0 -4,7

4.3.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos

Para demonstrar a aplicação do método, amostras de plasma de pacientes em tratamento com a LTG foram analisadas. A Figura 23 apresenta o eletroferograma referente à análise da amostra de plasma de um paciente em tratamento, a Figura 24 e a Tabela 10 apresentam os resultados referentes à análise quantitativa da LTG nos 12 pacientes epilépticos em tratamento com a LTG. Todas as amostras foram positivas para o fármaco em questão e puderam ser analisadas pelo método proposto. Como mencionado anteriormente, o nível terapêutico da LTG não é muito bem determinado e, apesar de alguns autores citarem valores de concentração entre 1 a 4 µg mL^{-1}, alguns trabalhos relatam valores maiores do que 10 µg mL^{-1} (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; SARACINO et al., 2007;

NIKOLAOU et al., 2015; KIM et al., 2015) o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

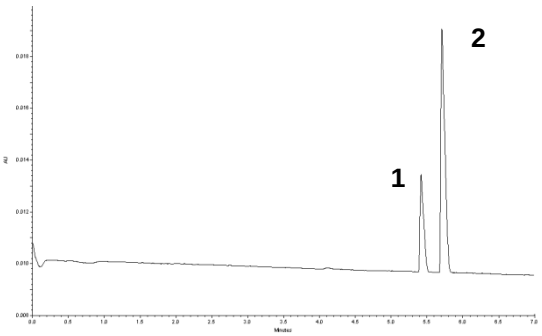

Figura 23 - Eletroferograma referente à análise da amostra de plasma de um paciente em tratamento com a LTG. 1) PI e 2) LTG (concentração de 10,23 µg mL^{-1})

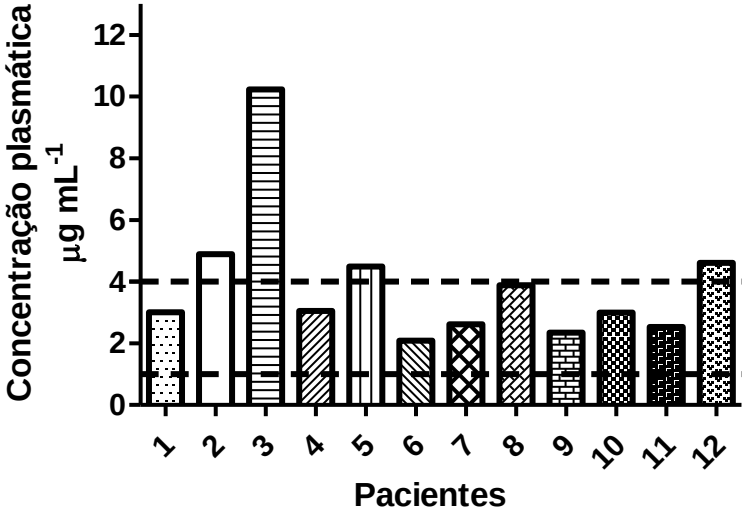

Figura 24 - Concentrações plasmáticas da LTG em paciente epilépticos. F= sexo feminino, M= sexo masculino

4.4 Avaliação da DLLME para análise da LTG em plasma

A avaliação de alguns parâmetros que influenciam o procedimento de preparo de amostra é essencial para alcançar maiores valores de recuperação do composto em estudo. No caso da DLLME os parâmetros avaliados foram:

- Precipitação proteica com os solventes orgânicos: acetonitrila, metanol, etanol e acetona;
- Volume do solvente orgânico para precipitar proteínas: 0,5, 0,75 e 1 mL;
- pH da fase aquosa: 5, 6, 7, 8, 9 e 10;
- Tipo do solvente extrator: tetracloroetileno, clorofórmio e diclorometano;

- Volume do solvente extrator: 60, 80, 100, 120, 140 e 160 µL;
- Tempo da DLLME assistida por ultrassom: 0, 30 e 60 segundos;
- Tempo da DLLME assistida por *vortex*: 0, 30 e 60 segundos;
- *Salting out:* adição de NaCl nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 %.

A fase aquosa foi composta por 1,3 mL do sobrenadante proveniente do pré-tratamento da amostra (que continha a LTG e o PI) por precipitação proteica, e 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} para manter o pH da amostra constante.

4.4.1 Pré-tratamento da amostra por precipitação proteica

A ligação dos fármacos a proteínas é uma das dificuldades no uso do plasma como material biológico em procedimentos de extração (DE OLIVEIRA et al., 2008). A precipitação proteica tem sido utilizada para preparo de amostras complexas como plasma, soro e sangue total. Todavia, esse preparo também pode ser realizado anteriormente a outro método de extração para melhorar a eficiência de extração. Para isso podem ser utilizadas soluções ácidas, sais ou solventes orgânicos (BUENO; SILVA; QUEIROZ, 2011). Previamente à realização da DLLME o pré-tratamento da amostra de plasma se faz necessário. Esse pré-tratamento pode ser feito por diluição, precipitação de proteínas, centrifugação e/ou filtração da amostra (SARAJI; BOROUJENI, 2014). Muitos autores empregaram a precipitação de proteínas com acetonitrila (FERNÁNDEZ et al., 2015; JOUYBAN et al., 2015) e metanol (FERNÁNDEZ et al., 2013; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011) como pré-tratamento da amostra.

Para a DLLME foi avaliada a precipitação de proteínas com solvente orgânico como pré-tratamento da amostra. Para ajudar na seleção do solvente orgânico mais apropriado, foram observados alguns aspectos visuais como a aparência do sobrenadante em relação à sua limpidez e a formação da fase sedimentada. Além disso, uma vantagem em precipitar as proteínas com solventes orgânicos é que os solventes utilizados na precipitação de proteínas podem ser utilizados também como solventes dispersores na DLLME (JOUYBAN et al., 2015), uma vez que os solventes comumente utilizados para precipitar as proteínas também apresentam as características exigidas para os solventes dispersores, ou seja, apresentam boa

miscibilidade tanto com a fase aquosa quanto com o solvente extrator. Assim, o mesmo solvente utilizado para precipitar as proteínas foi utilizado como solvente dispersor. Outros trabalhos descritos na literatura também utilizam o solvente orgânico usado no processo de precipitação de proteínas como solvente dispersor (FERNÁNDEZ et al., 2013; JOUYBAN et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2015).

Para definir o solvente orgânico para precipitação proteica, foram avaliados a acetonitrila, o metanol, o etanol e a acetona. Assim, aos tubos contendo 500 µL de plasma branco fortificado com LTG, foi adicionado 1 mL de cada solvente orgânico citados acima para serem avaliados. A seguir, os tubos foram agitados por 2 minutos no *vibrax* e em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 2300 x *g*. O sobrenadante foi coletado e realizada a DLLME. Como pode ser observada na Figura 25, a acetonitrila foi o solvente orgânico que proporcionou os melhores valores de recuperação da LTG e, portanto, foi utilizada para os experimentos posteriores.

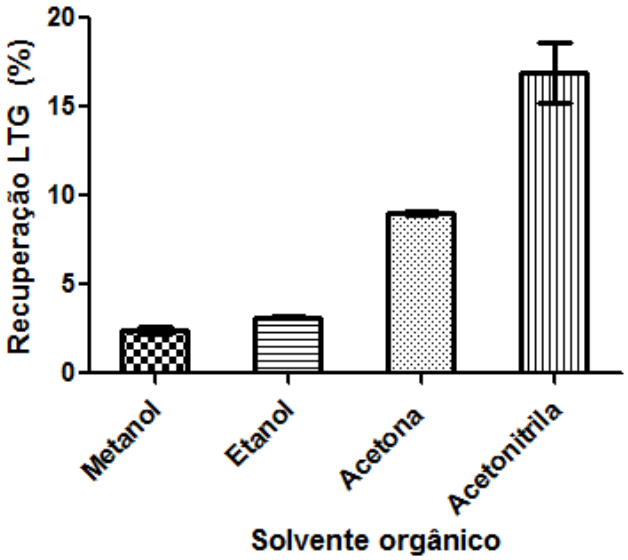

Figura 25 - Avaliação do solvente orgânico para precipitar as proteínas plasmáticas para extração da LTG por DLLME. Volume do solvente para precipitação: 1 mL. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio

Após ter sido selecionado o solvente para precipitar as proteínas, o volume deste solvente foi avaliado (Figura 26). Assim, em 500 µL de plasma branco foram adicionados 0,5, 0,75 ou 1 mL de acetonitrila, os volumes finais do sobrenadante recuperados foram de 0,75, 1 e 1,3 mL respectivamente. Entretanto, os volumes de 0,5 e 0,75 mL de acetonitrila não foram suficientes para precipitar por completo as

proteínas das amostras de plasma e proporcionaram sobrenadantes ainda turvos o que comprometia a formação da fase sedimentada quando realizada a DLLME. Já o volume de 1 mL foi suficiente para precipitar as proteínas e obter um sobrenadante mais límpido para a realização da DLLME. Além disso, o volume de 1 mL também proporcionou maior porcentagem de recuperação da LTG, provavelmente devido a melhor dispersão do solvente extrator quando realizada a DLLME (NAEENI; YAMINI; REZAEE, 2011).

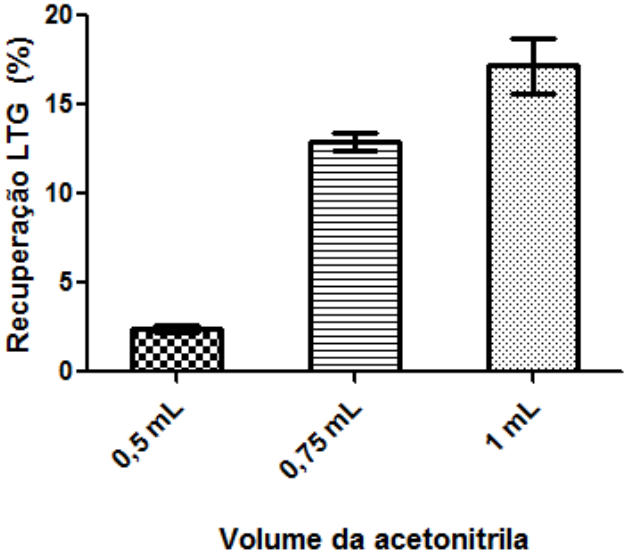

Figura 26 - Influência do volume do solvente orgânico para precipitar as proteínas plasmáticas na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio

4.4.2 Efeito do pH da fase aquosa

Do mesmo modo que ocorre no método da HF-LPME, o pH da fase aquosa deve ser ajustado de acordo com as propriedades físico-químicas do analito para mantê-lo em sua forma não ionizada e favorecer a sua solubilidade no solvente orgânico (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Para verificar a influência do pH da fase aquosa o mesmo foi avaliado nos valores de 5, 6, 7, 8, 9 e 10, para garantir que a LTG permanecesse na forma não ionizada (Figura 8), uma vez que ela é uma base fraca (pKa 5,7). Assim, 1,3 mL do sobrenadante proveniente da precipitação proteica com acetonitrila e 4 mL da solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} constituiram a fase aquosa.

Pode ser observado pelos resultados obtidos e apresentados na Figura 27 que altos valores de pH forneceram maiores valores de recuperação. Entretanto,

acima do pH 9,0 não houve diferença significativa e portanto, o pH 9,0 foi selecionado.

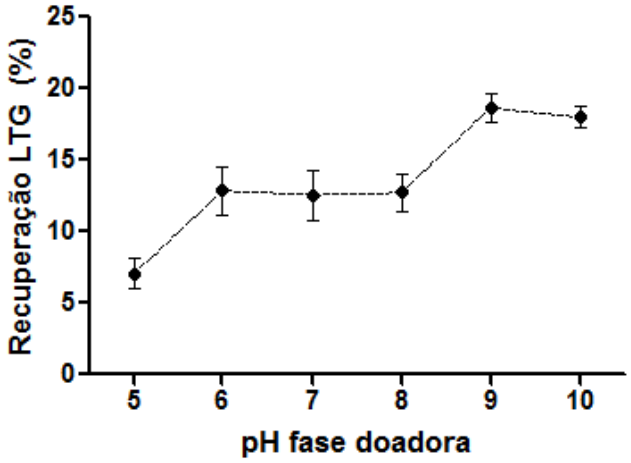

Figura 27 - Influência do pH da fase aquosa na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}. Solvente extrator: 100 µL de clorofórmio

4.4.3 Efeito do tipo de solvente extrator

A seleção do solvente extrator é um dos fatores mais importantes que influencia na recuperação e seletividade do método frente ao analito em estudo (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Além disso, ele deve apresentar características como capacidade de extrair o analito de interesse, baixa solubilidade em água, ser capaz de formar o ponto nuvem juntamente com o solvente dispersor e ser mais denso do que a amostra em estudo para ser capaz de formar a fase sedimentada (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Devido à necessidade dessas características, apenas alguns solventes foram testados como tetracloroetileno, clorofórmio e diclorometano.

Dentre os solventes testados, o tetracloroetileno somente extraiu o PI. Entre o diclorometano e o clorofórmio, este último foi o que proporcionou os melhores valores de recuperação para a LTG e por isto foi selecionado como solvente extrator (Figura 28). Na literatura há uma grande diversidade no tipo de solvente extrator empregado. Para a análise de outros compostos, o clorofórmio já foi utilizado como solvente extrator (DE ALBUQUERQUE; de GAITANI; DE OLIVEIRA, 2015; REZAEE et al., 2009) e outros trabalhos utilizaram o tetracloreto de carbono (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; MAHAM et al., 2014) por proporcionar maiores valores de

recuperação. Entretanto, devido a sua alta toxicidade, o tetracloreto de carbono não foi utilizado neste estudo.

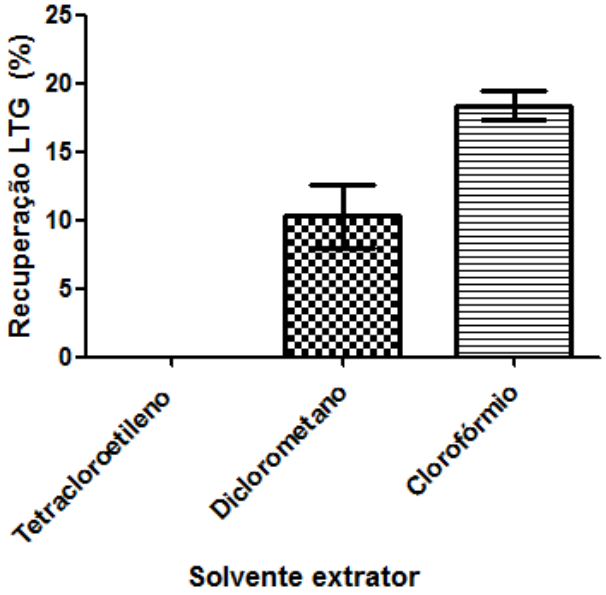

Figura 28 - Influência do tipo de solvente extrator na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 100 µL

4.4.4 Efeito do volume do solvente extrator

Para avaliar a influência do volume do solvente extrator na DLLME, os volumes de 60, 80, 100, 120, 140 e 160 µL de clorofórmio foram injetados na fase aquosa composta por 1,3 mL do sobrenadante proveniente da precipitação proteica com acetonitrila e 4 mL da solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. De acordo com os resultados mostrados na Figura 29, à medida que o volume do solvente extrator aumentou foi observado aumento nos valores de recuperação da LTG. Entretanto, em valores acima de 120 µL não foi observada diferença estatística em relação à porcentagem de recuperação.

Esse aumento de recuperação da LTG, de acordo com o aumento de volume do solvente extrator, acontece devido à maior partição do analito para o clorofórmio (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Visando uma diminuição de consumo de solvente clorado e ainda mantendo o compromisso com o melhor valor de recuperação, 120 µL foi o volume selecionado.

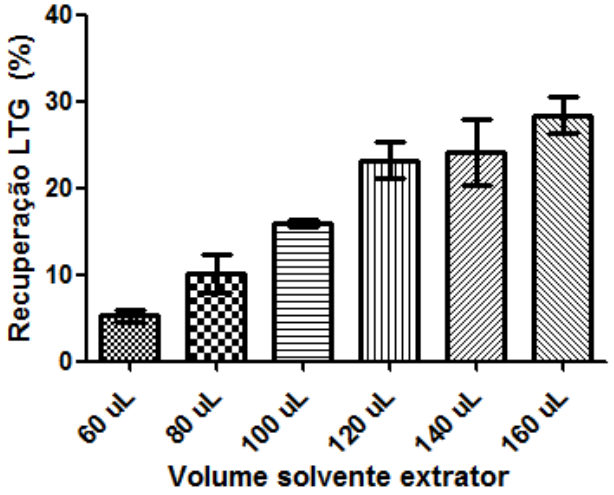

Figura 29 - Efeito do volume do solvente extrator na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: clorofórmio

4.4.5 DLLME assistida por *vortex* e ultrassom

Após a formação do ponto nuvem, a área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa é infinitamente grande, o que faz com que a transferência do analito entre as fases seja rápida (REZAEE et al., 2006). Desse modo, para tentar favorecer a partição do analito para o solvente extrator, e com o intuito de melhorar a eficiência da extração da LTG, a DLLME assistida por *vortex* nos tempos de 0, 30 e 60 segundos (Figura 30A) e por ultrassom nos tempos de 0, 30 e 60 segundos (Figura 30B) foram avaliadas.

O uso do *vortex* proporcionou ampla dispersão do solvente extrator na fase aquosa. Entretanto, não houve melhora significativa na eficiência de extração (Figura 30A). Este resultado corrobora com os obtidos por Alshana et al., (2013) e de Albuquerque, de Gaitani e de Oliveira (2015).

O uso do ultrassom também favoreceu a dispersão do solvente extrator na fase aquosa, porém não demonstrou melhora na eficiência da extração da LTG (Figura 30B). Os mesmos resultados foram obtidos por de Albuquerque, de Gaitani e de Oliveira (2015) no qual a DLLME assistida por ultrassom também não proporcionou melhoras nos valores de recuperação no processo de extração.

Portanto, somente o ponto nuvem foi necessário para garantir o equilíbrio entre as fases.

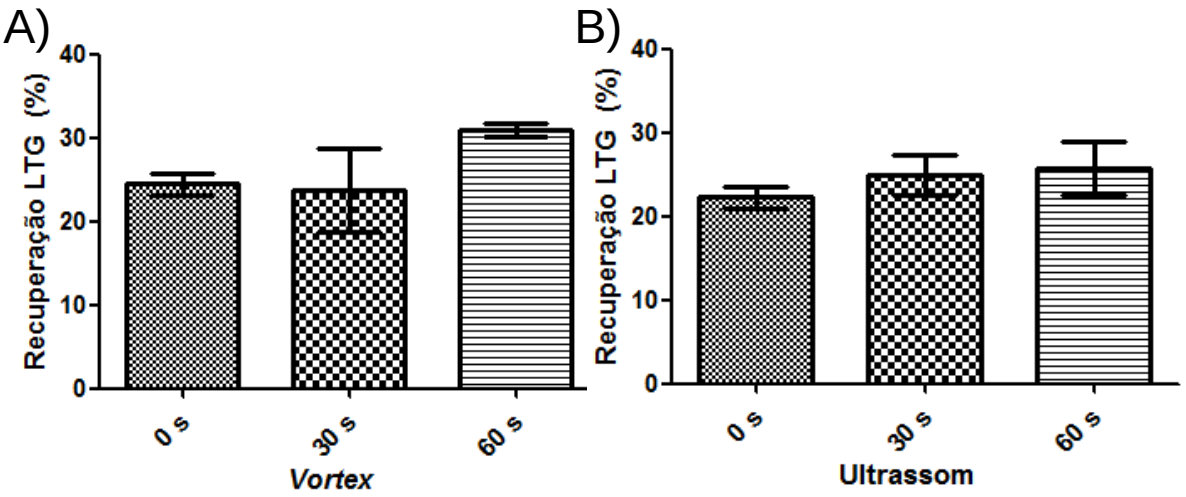

Figura 30 - Avaliação da DLLME assistida por *vortex* (30A) e ultrassom (30B) na extração da LTG em diferentes tempos. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 120 µL de clorofórmio

4.4.6 Efeito *salting out* na amostra

Na DLLME, esse efeito foi avaliado pela adição de cloreto de sódio na fase aquosa (composta por 1,3 mL do sobrenadante proveniente da precipitação proteica com acetonitrila e 4 mL da solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0) nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 % (massa/volume). Após a adição do sal, não foram observadas melhoras significativas na eficiência de extração da LTG (Figura 31). Portanto, a extração da LTG por DLLME foi feita sem adição de sal.

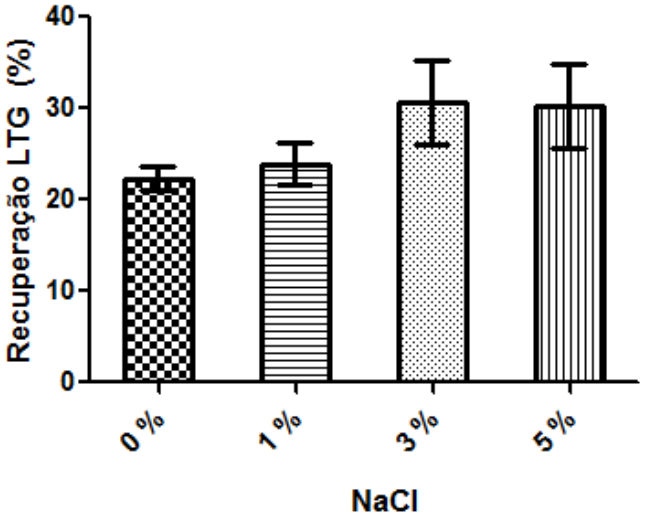

Figura 31 - Influência da adição de sal na extração da LTG por DLLME. Solvente para precipitação: 1 mL de acetonitrila. Fase aquosa: 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Solvente extrator: 120 µL de clorofórmio

4.4.7 Condições estabelecidas para extração da LTG por DLLME

Após todos os parâmetros serem avaliados, as condições selecionadas para a extração da LTG em amostras de plasma por DLLME foram: 500 µL de plasma adicionados de 1 mL de acetonitrila para precipitação de proteínas, a amostra foi agitada por 2 minutos a 1500 rpm em um agitador *vibrax* e, em seguida, centrifugada a 4°C, por 15 minutos, a 2300 x *g*. Após a precipitação das proteínas, 1,3 mL do sobrenadante foram recuperados e adicionados 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0. Em seguida foram injetados bruscamente 120 µL de clorofórmio e a amostra foi novamente centrifugada a 4°C, por 15 minutos, a 2300 x *g*. Em seguida, 160 µL de fase sedimentada foram recuperados, evaporados sob fluxo de ar comprimido e ressuspendidos em 100 µL da solução água:metanol (1:1, v/v). Nessas condições foi possível obter porcentagem de recuperação de 23 % da LTG.

O eletroferograma de uma amostra de plasma fortificado com LTG e extraída por DLLME nas condições selecionadas é mostrado na Figura 32A.

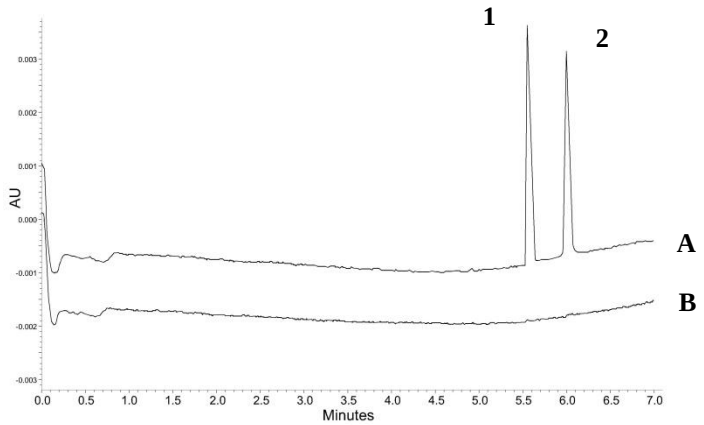

Figura 32 - Eletroferogramas referentes à análise de (A) amostra fortificada com LTG e extraída por DLLME nas condições otimizadas. 1) PI e 2) LTG 10 µg mL^{-1} ; (B) amostra de plasma branco extraído por DLLME

4.5 Validação do método analítico

4.5.1 Linearidade e LIQ

A linearidade foi avaliada em triplicata fortificando-se alíquotas de 500 µL de plasma, as quais foram submetidas ao procedimento de extração descrito na Figura 7 As concentrações plasmáticas empregadas foram de 1; 2; 4; 8; 10; 15 e 20 µg mL^{-}

[1]. As concentrações do LIQ (1 µg mL^{-1}), CQB (2 µg mL^{-1}), CQM (10 µg mL^{-1}) e CQA (15 µg mL^{-1}) foram as mesmas utilizadas no procedimento da HF-LPME. A lidocaína também foi utilizada como PI na concentração plasmática de 5 µg mL^{-1}.

A análise estatística dos dados foi realizada similarmente ao item 4.3.1. A correlação entre concentração e a razão entre a área da LTG e do PI foi feita por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para se obter a equação da reta e o coeficente de correlação (r). A análise estatística dos dados foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, com os cálculos dos valores de F e *p* para a LTG, para um nível de confiança de 95%.

Os dados da Tabela 8 mostram que o modelo linear de regressão está bem ajustado.

Tabela 8 - Linearidade do método para análise da LTG por DLLME

Faixa linear (µg mL^{-1})	Equação linear	r	ANOVA *Lack of fit*	
			F	*p*
1,0 – 20,0	y = 0,0799x + 0,0078	0,9958	0,71	0,624

r = coeficiente de correlação, $F_{Tabelado}$ = 2,445

4.5.2 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram realizadas em quintuplicata pela fortificação de 500 µL de plasma nas concentrações plasmáticas do LIQ, CQB, CQM e CQA da LTG e 5 µg mL^{-1} do PI. As amostras foram extraídas de acordo com o procedimento descrito na Figura 7 e o CV% e o EPR% foram calculados. A precisão e exatidão intracorridas (n=5) foram determinadas em um mesmo dia, e a precisão e exatidão intercorridas foram determinadas em 3 dias consecutivos e os resultados estão resumidos na Tabela 9. Todos os valores estão abaixo dos preconizados pelos guias da Anvisa e EMA (abaixo de 20% para o LIQ e abaixo de 15% para o CQB, CQM e CQA).

Tabela 9 - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas[a] (n=5) do método para análise da LTG por DLLME

	Concentração nominal µg mL^{-1})	Concentração obtida µg mL^{-1})	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
LIQ	1,0	0,9	18,3	-10,0
Intradia	1,0	1,1	9,9	10,0
	2,0	2,1	4,4	5,0
	10,0	10,1	3,9	1,0
	15,0	15,1	1,7	0,7
Interdia[a]	1,0	0,9	11,1	-10,0
	2,0	1,9	8,1	-5,0
	10,0	9,6	9,6	-4,0
	15,0	14,6	3,2	-2,7

[a], em três dias consecutivos

4.5.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de 6 amostras de fontes diferentes de plasma branco, sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada. Além disso, também foram avaliadas amostras contendo outros fármacos possivelmente coadministrados aos pacientes. Para isso foi realizada a análise eletroforética desses fármacos nas condições estabelecidas para análise da LTG. Nenhum dos fármacos testados apresentou tempo de migração igual ou próximo ao da LTG ou PI.

O método foi seletivo e não apresentou nenhum sinal interferente no tempo de migração da LTG ou do PI. A Figura 32B representa uma amostra de plasma branco extraído pela DLLME.

4.5.4 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado pela análise de uma amostra de plasma branco, seguida pela análise de uma amostra de plasma branco fortificado na concentração do LSQ, e de duas amostras de plasma branco novamente. Todas as amostras

foram submetidas ao procedimento de extração pela DLLME e não foi observado efeito residual.

4.5.5 Estabilidade

Uma vez que os testes de estabilidade da LTG foram os mesmos realizados para a HF-LPME, estes não foram realizados na DLLME.

4.5.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos

Para demostrar a aplicação do método, amostras de plasma de pacientes em tratamento com a LTG que foram analisados pelo método da HF-LPME foram também analisadas pelo método da DLLME. Entretanto, nem todas as amostras puderam ser analisadas devido ao reduzido volume de plasma disponível, assim, somente 8 amostras puderam ser processadas e analisadas. A Figura 33 apresenta o eletroferograma de uma amostra de plasma de paciente após o processo de extração por DLLME. Em relação à análise quantitativa, todas as amostras foram positivas para o fármaco em questão e puderam ser analisadas pelo método proposto (Figura 34 e Tabela 10).

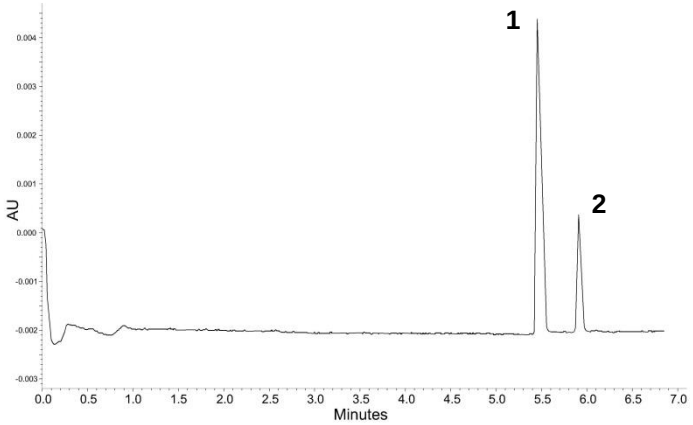

Figura 33 - Eletroferograma de uma amostra de plasma de paciente sob tratamento com a LTG após o processo de extração pela DLLME. 1) PI e 2) LTG 4,7 µg mL^{-1}

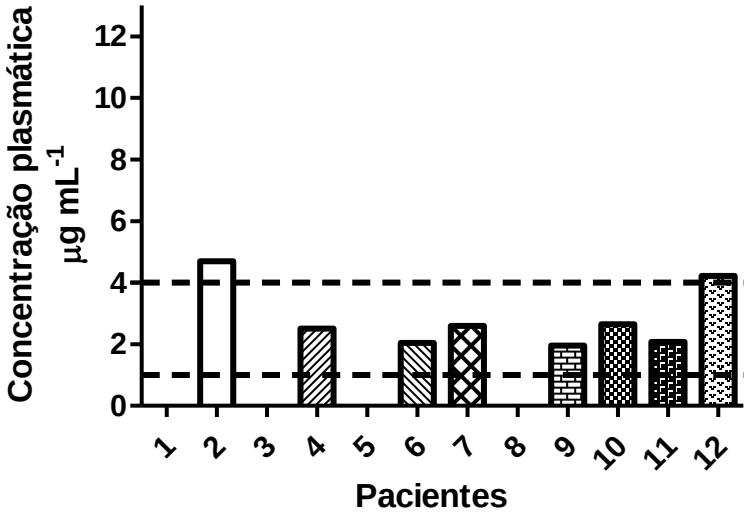

Figura 34 - Concentrações plasmáticas da LTG em paciente epilépticos. F= sexo feminino, M= sexo masculino

4.6 Análise estatística dos pacientes nos métodos da HF-LPME e DLLME

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de wilcoxon comparando-se as concentrações obtidas pelo método da HF-LPME e pelo método da DLLME (dos pacientes 02, 04, 06, 07, 09, 10 11 e 12 que puderam ser analisadas por ambas técnicas). O valor de *p* foi de 0,1995. Através da análise estatística é possível concluir que não houve diferença na quantificação da LTG quando os dois métodos foram comparados.

Tabela 10 – Comparação da quantificação da LTG pela HF-LPME e DLLME

Quantificação da LTG nos Pacientes	HF-LPME (µg mL^{-1})	DLLME (µg mL^{-1})
01	3,0	X
02	4,9	4,7
03	10,2	X
04	2,5	3,0
05	4,5	X
06	2,0	2,0
07	2,6	2,6
08	3,9	X
09	2,3	2,0
10	3,0	2,7
11	2,5	2,1
12	4,6	4,2

4.7 Comparação entre HF-LPME e DLLME

A utilização da HF-LPME em associação com a CE mostrou ser uma ótima combinação que conferiu simplicidade, detectabilidade, seletividade, exatidão, precisão, recuperação de 54,3 % e baixo custo de operação. O método apresentou faixa de concentração plasmática que, de acordo com a literatura e com os resultados das amostras analisadas dos pacientes, abrange a faixa terapêutica da LTG encontrada nos pacientes. Ademais, apesar do plasma ser uma amostra biológica complexa, não foi necessário o pré-tratamento dessas amostras, pois o diâmetro dos poros da fibra impede a passagem de macromoléculas como as proteínas plasmáticas. Outra facilidade da técnica foi de não haver a necessidade de centrifugação ou evaporação da amostra, pois a fase aceptora está protegida de material particulado dentro da fibra e pode ser analisada diretamente no equipamento de CE, o que favorece a automação da técnica. Além disso, a união da técnica de CE com a HF-LPME apresenta baixo consumo de solvente orgânico, o que a torna bastante atrativa devido à redução na produção de resíduos químicos e seu descarte, e diminuição do contato do analista com solventes tóxicos. Por outro lado, a desvantagem desta técnica foi o longo tempo de agitação (30 minutos). Entretanto, isso foi minimizado porque grande parte das amostras pode ser extraída ao mesmo tempo com o uso do agitador *vibrax* (36 amostras), além de essa desvantagem ser ínfima frente às vantagens citadas acima, pois outros passos que demandam mais tempo, como centrifugação e evaporação da amostras, não precisaram ser realizados.

Na associação da DLLME com a CE, o método desenvolvido apresentou detectabilidade adequada, apesar da recuperação do analito ser de 23 %, muito inferior em comparação com a HF-LPME, mas do mesmo modo possibilitou a quantificação da LTG dentro da faixa de concentração plasmática encontrada nos pacientes. Além disso, o método desenvolvido foi rápido, o procedimento de baixo custo e não necessitou de materiais específicos para sua realização. Apesar desta técnica ter sido desenvolvida para amostras de água, esta se mostrou versátil, pois foi possível sua aplicação em uma matriz mais complexa como o plasma. Entretanto, suas principais desvantagens foram a utilização de solvente clorado (clorofórmio), o qual é muito tóxico, a necessidade de pré-tratamento da amostra para remoção das

proteínas e a etapa de centrifugação, que dificulta a automação da técnica e torna o procedimento mais longo.

Assim, a HF-LPME se mostrou uma técnica mais sensível com maior valor de recuperação da LTG, não necessitou de pré-tratamento da amostra, é uma técnica mais rápida de ser realizada, com possibilidade de automação e houve um reduzido consumo de solvente orgânico. Devido a essas vantagens, a HF-LPME se mostrou uma técnica mais promissora para análise de rotina em matrizes complexas.

Conclusão

"Lord, we ain't what we oughta be.
We ain't what we want to be.
We ain't what we gonna be.
But, thank God, we ain't what we was."
(Martin Luther King, Jr.)

5. CONCLUSÃO

Este trabalho descreveu pela primeira vez o desenvolvimento e validação de duas técnicas de microextração em fase líquida, HF-LPME e DLLME, para a determinação da LTG em plasma de pacientes epilépticos por CE.

Primeiramente, as condições eletroforéticas foram otimizadas e então empregadas em todas as amostras subsequentes do estudo. A CE mostrou-se eficiente na análise da LTG juntamente com o PI, com tempo de migração da LTG por volta de 6 minutos. As técnicas de microextração em fase líquida, HF-LPME e DLLME, foram desenvolvidas e avaliadas de acordo com o melhor desempenho de recuperação da LTG. Após as condições ótimas de extração serem estabelecidas, os métodos foram validados de acordo com os guias da Anvisa e EMA, e os parâmetros de desempenho analítico apresentaram resultados satisfatórios. A etapa prática final consistiu na aplicação dos dois métodos em amostras de plasma de pacientes epiléticos em tratamento com LTG e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP. Todas as amostras foram positivas e estavam dentro da faixa de concentração plasmática abrangida por esse estudo, o que faz com que ambos os métodos possam ser empregados na rotina.

Por fim, foi realizada uma comparação entre as duas técnicas de microextração. Em relação à HF-LPME, essa se mostrou mais vantajosa devido a baixa quantidade de solvente orgânico utilizado (por volta de 30 µL por amostra), facilidade e menor tempo de preparo, e maior valor de recuperação da LTG. Em relação à DLLME, essa se mostrou uma extração mais laboriosa com a necessidade de etapas de pré-tratamento, centrifugação e evaporação das amostras, além do uso de solventes orgânicos clorados. Portanto, a HF-LPME é uma técnica promissora para análise de rotina em matrizes complexas, com reduzido consumo de solvente orgânico, além da possibilidade de automação.

Referências

Referencias

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanáliticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012.

ALDAZ, A.; FERRIOLS, R.; AUMENTE, D.; CALVO, M. V.; FARRE, M. R.; GARCÍA, B.; MARQUÉS, R.; MAS, P.; PORTA, B.; OUTEDA, M.; SOY, D. Pharmacokinetic monitoring of antiepileptic drugs. **Farm Hosp**. v. 35, n. 6, p. 326-339, 2011.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; GUPTA; V. K. Precision in capillary electrophoresis. **Anal Lett**. v. 39, n. 11, p. 2345-2357, 2006.

ALSHANA, U.; LUBBAD, I.; GÖĞER, N. G.; ÇOK, I.; TAMER, U.; ERTAŞ, N. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Combined with Counter-Electroosmotic Flow Normal Stacking Mode in Capillary Electrophoresis for the Determination of Bisphenol a in Water and Urine Samples. **J Liq Chromatogr Relat Technol.** v. 36, n. 20, p. 2855-2870, 2013.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: Human Press. 1996. 349 p.

ANDRUCH, V.; BALOGH, I.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J. Five Years of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Appl Spectrosc.** v. 48, n. 3, p. 161-259, 2012.

ARCE, L.; NOZAL, L.; SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis. **Trends Analyt Chem**. v. 28, n. 7, p. 842-853, 2009.

ASENSIO-RAMOS, M.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **J Chromatogr A**. v. 1218, n. 42, p. 7415-7437, 2011.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**. v. 1016, n. 1, p. 11-20, 2003.

BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE , M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; BOAS, W.V.E.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; NORDI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Comission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**. v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M. R.; AGHAEE, E. 'Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography-Flame Photometric Detection. Very Simple, Rapid and Sensitive Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Water. **J Chromatogr A.** v. 1123,

n. 1, p. 1-9; 2006.

BRODIE, M.J.; COVANIS, A.; GIL-NAGEL, A.; LERCHE, H.; PERUCCA, E.; SILLS, G.J.; WHITE, H.S. Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter? **Epilepsy & behavior**. v. 21, n. 4, p. 331-341, 2011.

BUENO, J. S.; SILVA, B. J. G.; M. E. C. QUEIROZ. Enantioselective Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma Samples by Protein Precipitation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 22, n. 7, p. 1221-1228, 2011.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Anal Chim Acta.** v.665, n. 1, p. 55-62, 2010.

CARRÃO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; DE OLIVEIRA, A. R. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**. v. 32, n. 19, p. 2746-2756, 2011.

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

CHA, Y. B.; MYUNG, S. W. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine sample using HPLC/UV and three phase hollow fiber-liquid phase microextraction (HF-LPME). **Bull Korean Chem Soc**. v. 34, n. 11, p. 3444-3450, 2013.

Chemicalize. Ionização da lamotrigina disponível em <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=lamotrigine&source=fp>. Acesso em 01 fev de 2016.

CHENG C. L.; CHOU, C. H.; HU, O. Y. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B.** v. 817, n. 2, p. 199-206, 2005.

DE ALBUQUERQUE, N. C.; de GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. A new and fast DLLME-CE method for the enantioselective analysis of zopiclone and its active metabolite after fungal biotransformation. **J Pharm Biomed Anal**. v. 109, p. 192-201, 2015.

DE GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Capillary electromigration techniques for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices: a critical appraisal. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 12, p. 229-245.

DE MORAES, M. L. L.; DE MORAES, S.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Quim Nova.** v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim Nova**. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

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**. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 900, p. 48-58, 2012.

DICKINS, M.; CHEN, C. Lamotrigine: chemistry, biotransformation and pharmacokinetics. In: LEVY, R. H.; MATTSON, R. H.; MELDRUM B. S.; PERUCCA, E. (Ed.). **Antiepileptic Drugs.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. cap 35, p. 370-379. Disponível em <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 31 Jan. 2014.

DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B. DOS; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida, **Scientia Chromatographica.** v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

DOLAN, J. W. **Peak tailing and resolution.** Local: 2002. Disponível em: < http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/8dbc54e4-8988-4615-91dc-b0c394633f89/article-19199.pdf>. Acesso em: 06 Jan. 2016.

EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y.; FIROZJAEI, H. A.; KAMAREI, F.; TAVASSOLI, N.; ROUINI, M. R. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of gabapentin in biological samples. **Anal Chim Acta**. v. 665, n. 2, p. 221-226, 2010.

EMÍDIO, E. S.; de MENEZES PRATA, V.; de SANTANA, F. J.; DÓREA, H. S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **J Chromatogr B**. v. 878, n. 24, p. 2175-2183, 2010.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Anal Chim Acta.** v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guiderline on bioanalytical method validation. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em 01 fev de 2016.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D. J.; BAKHTIYARI, R. F. Use of a Capillary Tube for Collecting an Extraction Solvent Lighter Than Water after Dispersive Liquid-Liquid

Microextraction and Its Application in the Determination of Parabens in Different Samples by Gas Chromatography--Flame Ionization Detection. **Talanta.** v. 81, n. 4-5, p. 1360-1367, 2010.

FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, C.; PENA, M. T.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Anal Chim Acta**. v. 767, p. 88-96, 2013.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **J Appl Toxicol.** v. 35, n. 4, p. 418-425, 2015.

FISHER, R.S.; BOAS, W.V.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J JR. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**. v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Lamictal**: lamotrigine, prescribing information. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020241s037s038,020764s030s031lbl.pdf>. Acesso em: 02 Jan. 2016.

FORTES, S. S. Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina. 2013. 103 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; REUBSAET, J. L. E.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry Rapid screening of amphetamines from biological matrices. **J Sep Sci**. v. 24, n. 7, p. 615–622, 2001.

HAN, D.; ROW, K. H. Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples. **Microchim Acta**, v. 176, p. 1–22, 2012.

HEYMAN, E.; LAVIE, R.; LAHAT, E.; BRAUNSTEIN, R.; BAR-HAIM, A.; BERKOVITCH, M.; GANDELMAN-MARTON, R. Lamotrigine serum concentration in children with epilepsy. **Pediatr Neurol**. v. 47, n. 6, p. 427-430, 2012.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAAR, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction. **J Chromatogr A**. v. 963, n. 1-2, p. 3-17, 2002.

HOTHA, K. K.; KUMAR, S. S.; BHARATI, D. V.; VENKATESWARULU, V. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. **Biomed Chromatogr.** v. 26, n. 4, p. 491-496, 2011.

HUO X, LI Q, LIN X, CHEN X, BI K. Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Six Fungicides in Fruit Samples by GC-ECD, **Chromatographia**. v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 2011.

JOUYBAN, A.; SOROURADDIN, M. H.; FARAJZADEH, M. A.; SOMI, M. H.; FAZELI-BAKHTIYARI, R. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 134, p. 681-689, 2015.

KIM, H. J.; KIM, T. E.; JOO, E. Y.; SEO, D. W.; LEE, S. Y.; HONG, S. B. Effect of comedication on lamotrigine clearance in Korean epilepsy patients. **Clin Chim Acta**, v. 438, p. 269-273, 2015.

KUBÁÑ, P.; SEIMAN, A.; KALJURAND, M. Sampling and quantitative analysis in capillary electrophoresis. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 3, p. 41-65.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis principles and practice**. Germany: Springer-Verlag, 1993. 370 p.

LANÇAS F. M.; SOZZA M. A., QUEIROZ, M. E. Simultaneous plasma lamotrigine analysis with carbamazepine, carbamazepine 10,11 epoxide, primidone, phenytoin, phenobarbital, and PEMA by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). **J Anal Toxicol.** v. 27, n. 5, p. 304-308, 2003.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**. v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. J **Chromatogr A**. v. 902, n. 1, p. 17-63, 2000.

MAGALHÃES, I. R. S., BONATO, P. S. Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma. **Anal Bioanal Chem.** v. 393, p. 1805-1813, 2009.

MAHAM, M.; KIAROSTAMI, V.; WAQIF-HUSAIN, S.; SHARIFABADI, M. K. Analysis of chlorpheniramine in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Scielo**. v. 50, n. 3, p. 551-557, 2014.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **J Chormatogr A.** v. 907, n. 1-2, p. 21-37, 2001.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman:** as bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. cap. 19. p. 447-468.

MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHERI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **J Sep Sci**. v. 34, n. 14, p. 1722-1729, 2011.

MORGAN, P. E.; FISHER, D. S.; EVERS, R.; FLANAGAN, R. J. A rapid and simple assay for lamotrigine in serum/plasma by HPLC, and comparison with an immunoassay. **Biomed Chromatogr.** v. 25, p. 775-778, 2011.

MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; RYVLIN, P.; TOMSON, T. Epilepsy: new advances. **The Lancet**, v. 385, p. 884–98, 2015.

NAEENI, H. N.; YAMINI, Y.; REZAEE, M. Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. **J Supercrit Fluids**. v. 57, n. 3, p. 219-226, 2011.

NIKOLAOU, P.; PAPOUTSIS, I.; DONA, A.; SPILIOPOULOU, C.; ATHANASELIS, S. Development and validation of a GC/MS method for the simultaneous determination of levetiracetam and lamotrigine in whole blood. **J Pharm Biomed Anal.** v. 102, p. 25-32, 2015

OGUNI, H. Diagnosis and treatment of epilepsy. **Epilepsia**. v. 45, n. 8, p. 13-16, 2004.

OJEDA, C B.; ROJAS, F.S. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: a review. **Chromatographia**. v. 69, n. 11-12, p. 1149-1159, 2009.

PAWLISZYN, J.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical microextraction: current status and future trends. **J Chromatogr Sci**. v. 44, n. 6, p. 291-307, 2006.

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

PERDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **J Chromatogr A**. v. 1184, n. 1-2, p. 132-142, 2008.

PERLATTI, B.; CARRILHO, E.; AGUIAR, F. A. Sample stacking: a versatile approach for analyte enrichment in CE and microchip-CE. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 2, p. 23-40.

PUCCI, V.; BUGAMELLI, F.; BACCINI, C.; RAGGI, M. A. Analysis of lamotrigine and its metabolites in human plasma and urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Electrophoresis**. v. 26, n. 4-5, p. 935-942, 2005.

PUCCI, V.; RAGGI, M. A. Analysis of antiepileptic drugs in biological fluids by means of electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**. v. 26, n. 4-5, p. 767-782, 2005.

RAJABI, M.; HAJI-ESFANDIARI, S.; BARFI, B.; GHANBARI, H. Ultrasound-Assisted Temperature-Controlled Ionic-Liquid Dispersive Liquid-Phase Microextraction Method for Simultaneous Determination of Anethole, Estragole, and Para-Anisaldehyde in Different Plant Extracts and Human Urine: A Comparative Study. **Anal Bioanal Chem.** v. 406, n. 18, p. 4501-4512, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos antiepilépticos. In:_____. **Rang & Dale:** Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsivier, 2008. cap. 40, p. 575 – 587.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Analyt Chem.** v. 23, p. 1-10, 2004.

REIJENGA, J. C.; VERHEGGEN, T. P. E. M.; MARTENS, J. H. P. A.; EVERAERTS, F. M. Buffer capacity, ionic strength and heat dissipation in capillary electrophoresis. **J Chromatogr A.** v.744, n.1-2, p. 147–153, 1996.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **J Chromatogr A**. v. 1216, n. 9, p. 1511-1514, 2009.

REZAEE, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M. R.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J Chromatogr A**. v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method. **J Chromatogr A.** v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

REZAEI, F.; BIDARI, A.; BIRJANDI, A. P.; MILANI HOSSEINI, M. R.; ASSADI, Y. Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Determination of Polychlorinated Biphenyls in Water. **J Hazard Mater**. v. 158, n. 2-3, p. 621-627, 2008.

ROZET, E.; RUDAZ, S.; MARINI, R. D.; ZIÉMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, Ph. Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. **Anal Chim Acta**. v. 702, n. 2, p. 160-171, 2011.

SARACINO, M. A.; BUGAMELLI, F.; CONTI, M.; AMORE, M.; RAGGI, M. A. Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma. **J Sep Sci.** v. 30, n. 14, p. 2249-2255, 2007.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trends Analyt Chem.** v. 29, n. 1, p. 1-14, 2010.

SARAJI, M; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. **Anal Bioanal Chem**. v. 406, n. 8, p. 2027-2066, 2014.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K.; BIDGOLI, A. A. H. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Anal Bioanal Chem**. v. 400, n. 7, p. 2149-2158, 2011.

SHIBATA, M.; HASHI, S.; NAKANISHI, H.; MASUDA, S.; KATSURA, T.; YANO, I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. **Biomed Chromatogr.** v. 26, n. 12, p. 1519-1528, 2012.

SHIHABI, Z. K.; OLES, K. S. Serum lamotrigine analysis by capillary electrophoresis. **J Chromatogr B**, v. 683, p. 119-123, 1996.

SIMÕES, A. R.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of isradipine and its main metabolite followed by chiral HPLC analysis: application to an in vitro biotransformation study. **Anal Bioanal Chem**. v. 399, n. 7, p. 2435-2443, 2011.

ST. LOUIS, E. K.; ROSENFELD, W. E.; BRAMLEY, T. Antiepileptic drug monotherapy: the initial approach in epilepsy management. **Curr Neuropharmacol**. v. 7, n. 2, p. 77-82, 2009.

STEINER, S.A.; FRITZ, J. S. Separation of organic cations using novel background electrolytes by capillary electrophoresis. **J Chromatogr A**. v.1192, n.1, p. 152–156, 2008.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTE, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Sci Int.** v. 92, n. 2, p. 75-88,1998.

THEURILLAT, R; KUHN, M.; THORMANN, W. Therapeutic drug monitoring of lamotrigine using capillary electrophoresis. Evaluation of assay performance and quality assurance over a 4-year period in the routine arena. **J Chromatogr A.** v. 979, n. 1-2, p. 353-368, 2002.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. 2. Ed. New York: Academic Press, 2000. 462 p.

WILLE, S. M.; LAMBERT, W. E. Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. **Anal Bioanal Chem**. v. 388, n. 7, p. 1381-1391, 2007.

YAZDI, A. S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S. R. Separation and Determination of Amitriptyline and Nortriptyline by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography Flame Ionization Detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p.1293-1299, 2008.

ZALEWSKA-KASZUBSKA, J.; BAJER, B.; GORSKA, D.; ANDRZEJCZAK, D.; DYR, W.; BIENKOWSKI, P. Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol preferring rats chronically treated with lamotrigine. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 7-12, 2015.

ZANG, X.H.; WU, Q.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chin J Anal Chem**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009.

ZAREI, A. R.; GHOLAMIAN, F. Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid in Pharmaceutical Formulation and Biological Samples, **Anal Biochem**, v. 412, n. 2, p.224-228, 2011.

ZHANG, Y.; LEE, H. K. Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **J Chromatogr A**. v. 1249, p. 25-31, 2012

ZHENG, J.; JANN, M. W.; HON, Y. Y.; SHAMSI, S. A. Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2033-2043, 2004.

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

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

Of. CEP/FCFRP nº. 005/2013
kms

Ribeirão Preto, 20 de março de 2013.

À Pós-graduanda
Luiza Saldanha Ribeiro Barros
Orientadora: Profª. Drª. Cristiane Masetto de Gaitani
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 113ª reunião ordinária realizada em 14.03.2013, o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DE MICROTÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE LAMOTRIGINA EM PLASMA DE PACIENTES EPILÉPTICOS POR ELETROFORESE CAPILAR**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 284.**

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 em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 – Fax: (16) 3602-4892