UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LARISSA ALVES DOS REIS DIAS

Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência

> Ribeirão Preto 2018

LARISSA ALVES DOS REIS DIAS

Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 28/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2018 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.

Dias, Larissa Alves dos Reis

Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência. Ribeirão Preto, 2018.

193 Folhas.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Gaitani, Cristiane Masetto de

1. Omeprazol. 2. Metabólitos 3. DLLME. 4. IL. 5. Delineamento experimental. 6. LLE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Larissa Alves dos Reis Dias

Título: Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banot	
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Á Deus pela força e coragem durante toda caminha, a meus pais Maura e Domingos. O meu futuro esposo, Thiago. A meu gato, Snow. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e esforço. Pela compreensão e apoio durante todo percurso.

AGRADECIMENTOS

Agrádeço á Deus, pois sem Ele eu não teriá forças para seguir nessá longa jornada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, por acreditar na minha competência, pela oportunidade dada, ensinamento e paciência. Obrigada por ser um exemplo do caminho a ser trilhado.

A funcionária do laboratório, Mariana Demets, pela amizade e companheirismo e auxílio neste trabalho. Aos pós-graduandos do Laboratório de técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da FCFRP - USP, pelo companheirismo e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – USP pela oportunidade. Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP, especialmente a Rosemary, a Rose, pela ajuda e companheirismo desde meu ingresso na USP. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e conversas. À Rosana e ao Henrique pelo atendimento sempre cordial, muito obrigada.

Ao professor Alexandre Souto Martinez pela contribuição estatística. As professoras Aline Thais Bruni e Delia Rita Tapia Blacido, pela contribuição quimiométrica. Prof. Giuliano Cesar Clososki e seu aluno Franco Jazon Caires.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

À Fapesp pelo suporte finànceiro. Processo nº 2015/12201-6. Muito Obrigada.

RESUMO

DIAS, L. A. R., Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência. 2018 193 folhas. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O OME é empregado no tratamento de curto e longo prazo em diferentes desordens gastrointestinais. É um inibidor da bomba de prótons, que atua seletivamente na enzima H⁺/K⁺ ATPase. É completamente metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 gerando três metabólitos principais: HOME, OMES e OS. É utilizado no tratamento de refluxo gastroesofágico em pacientes que sofrem de obesidade e sobrepeso no período anterior e posterior à cirurgia bariátrica. Entretanto, a realização deste procedimento cirúrgico pode prejudicar a absorção de nutrientes e medicamentos. Assim, a determinação das concentrações plasmáticas do OME é de grande importância clínica para o ajuste de dose evitando-se o comprometimento do tratamento. Portanto, foram desenvolvidos e validados dois métodos para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma: LLE, método padrão e OS-DLLME e avaliada a IL-DLLME como método alternativo de extração. O método padrão, LLE, foi desenvolvido para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma por HPLC-UV. A análise foi feita em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e FM composta por ACN: água (30:70, v/v), na vazão de 1 mL/min, detecção em 302 nm. Nestas condições foi possível a separação do OME e metabólitos em menos de 20 minutos. O método apresentou-se linear no intervalo de concentração plasmática de 20- 1000 ng/mL (r>0,99). Os parâmetros de precisão, exatidão, efeito carry-over e estabilidade estão em conformidade com o quia de validação da ANVISA (2012). O método foi satisfatoriamente aplicado em amostras de plasma de 20 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, no período pré e pós-cirúrgico. Outros dois métodos foram avaliados utilizando a técnica de microextração em fase líquida (DLLME). O método de OS-DLLME foi desenvolvido e validado para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma por LC-MS/MS. A análise foi realizada na mesma coluna cromatográfica descrita anteriormente com FM composta por ACN:tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5 (50:50, v/v) vazão de 0,4 mL/min. Foram monitorados os íons precursores do OME, HOME, OMES e PI. As amostras de plasma foram pré-tratadas com ISO e com sobrenadante foi desenvolvida a OS-DLLME. Os parâmetros da OS-DLLME (tipo e volume de solvente extrator e dispersor, pH, força iônica do meio, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de diluição da amostra e volume de amostra) foram otimizados com o auxílio de um delineamento experimental Plackett Burmann seguido por um CCD. Ao final uma metodologia de superfície de resposta facilitou a determinação da condição ótima de extração utilizando a ferramenta desejabilidade (D) na qual as condições otimizadas foram: 400µL de plasma, 2,5 mL de solução tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 120 µL de CHCl₃, 500 µL de ISO, 0% de NaCl, 5 minutos de centrifugação, sem agitação das amostras. Posteriormente, o método foi aplicado com sucesso para análise de

amostras de plasma de 5 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, no período pré e pós-cirúrgico.

A IL-DLLME foi avaliada como técnica de extração utilizando ILs como solventes extratores alternativos. A análise foi realizada na mesma coluna cromatográfica com fase móvel no modo eluição por gradiente composta por ACN:água: 0-10 min, 5:95; 10,0-15 min, 10:90; 15,01-40 min, 30:70, v/v, vazão de 1 mL/min e detecção em 302 nm. Foram avaliados três ILs comerciais e oito ILs sintetizados no laboratório (NPPNS). Foram avaliados os parâmetros da IL-DLLME: solvente dispersor, IL extrator, pH e composição da solução tampão. Também foi realizada a avaliação por RMN dos IL utilizados. Dentre os ILs comerciais foi selecionado o OMImPF₆, e dentre os ILs sintetizados foi selecionado o C₈PF₆. Entretanto, não foi possível o desenvolvimento do método devido a escassa quantidade de IL comercial. Em relação aos ILs sintetizados foram observados problemas na síntese e purificação, como presença de interferentes que coeluiam juntamente com os analitos avaliados. Entretanto, apesar deste método não ter sido validado foi possível obter valores de recuperação, para ambos os IL selecionados, superiores a 40%.

Palavras-chave: OME, LLE, OS-DLLME, delineamento experimental, IL-DLLME, líquidos iônicos.

DIAS, L. A. R., Development and validation of an ionic liquid dispersive liquid-liquid microextration method for determination of omeprazole in human plasma by high performance liquid chromatography. 2018 193 folhas. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

OME is used in the short- and long-term treatment of different gastrointestinal disorders. It is a proton pump inhibitor, which selectively acts on the enzyme H + / K + ATPase. It is completely metabolized by the cytochrome P450 enzymes generating three main metabolites: HOME, OMES and OS. It is used in the treatment of gastroesophageal reflux in patients who are obese and overweight in the period before and after bariatric surgery. However, performing this surgical procedure may impair the absorption of nutrients and medications. Thus, the determination of plasma concentrations of OME is of great clinical importance for dose adjustment, avoiding compromised treatment. Thus, two methods were developed for the quantification of OME and metabolites in plasma samples: LLE, standard method and OS-DLLME and IL-DLLME as an alternative method of extraction. The standard method, LLE, was developed for quantification of OME and metabolites in plasma samples by HPLC-UV. The analysis was done on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm particles) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and Zorbax Eclipse XDB-C18 (12, 5 mm x 4.6 mm, 5 µm particles) and mobile phase composed of ACN: water (30:70, v / v) at the flow rate of 1 mL / min, detection at 302 nm. Under these conditions it was possible to separate OME and metabolites in less than 20 minutes. The method was linear in the plasma concentration range of 20-1000 ng / mL (r> 0.99). The parameters of accuracy, accuracy, carry-over effect and stability are in accordance with ANVISA's validation guide (2012). The method was satisfactorily applied in plasma samples from 20 patients submitted to bariatric surgery in the pre- and post-surgery period. Two other methods were evaluated using the liquid phase microextraction technique (DLLME). The OS-DLLME method was developed and validated for quantification of OME and metabolites in plasma samples by LC-MS / MS. The analysis was performed in the same chromatographic column described above with mobile phase composed of ACN: 10 mM ammonium formate buffer pH 8.5 (50:50, v / v) flow rate of 0.4 mL / min. The precursor ions of OME, HOME, OMES and PI were monitored. Plasma samples were pre-treated with ISO and the supernatant was grown to OS-DLLME. The parameters of OS-DLLME (type and volume of solvent extractor and dispersant, pH, ionic strength of medium, agitation time, centrifugation time, sample dilution volume and sample volume) were optimized with the aid of an experimental design Plackett Burmann followed by a central composite outline. At the end, a response surface methodology facilitated the determination of the optimal extraction condition using the desirability tool (D) in which optimized conditions were: 400µL of plasma, 2.5 mL of buffer solution 0.1 mM sodium tetraborate pH 9,5, 120 µL CHCl₃, 500 µl ISO, 0% NaCl, 5 minutes centrifugation, without sample shaking. Subsequently, the method was validated and successfully applied for analysis of plasma samples from 5 patients submitted to bariatric surgery in the pre and post-surgical period. IL-DLLME was evaluated as an extraction technique using ILs as alternative extractive solvents. The analysis was performed on the

same mobile phase chromatographic column in the gradient elution mode composed of ACN: water: 0-10 min, 5:95; 10.0-15 min, 10:90; 15.01 - 40 min, 30:70, v/v, flow rate of 1 mL / min and detection at 302 nm. Three commercial ILs and eight ILs synthesized in the laboratory (NPPNS) were evaluated. The parameters of IL-DLLME were evaluated: dispersing solvent, IL extractor, pH and buffer composition. NMR evaluation of the ILs used was also performed. Among the commercial ILs, OMImPF6 was selected, and C8PF6 was selected among the ILs synthesized. However, the development of the method was not possible due to the small amount of commercial IL. Concerning ILs synthesized, problems were observed in the synthesis and purification, as presence of interfering factors that coeluted together with the analyzed analytes. Thus, although this method was not validated, it was possible to obtain recovery values, for both ILs selected, higher than 40%.

Keywords: OME, LLE, OS-DLLME, experimental design, IL-DLLME, ionic liquids.

Lista de Figuras

Figura 1: Ativação do pró-fármaco, OME, e inibição covalente da	a ATPase nos
canalículos da célula parietal	7
Figura 2: Ativação do pró-fármaco no canalículo da célula parietal e init	oição da bomba
de prótons	8
Figura 3: Principais metabólitos do OME	9
Figura 4: Extração por DLLME	15

Capítulo I

Figura 1.1: Fluxograma referente ao procedimento de extração do OME e metabólitos em amostras de plasma por LLE._____ 37 Figura 1.2: Fluxograma referente a coleta de sangue nos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica que fazem uso do OME._____ 43 Figura 1.3: Cromatograma referente à análise do HOME, OME e OMES em solução padrão (40 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm). FM: ACN: água (30:70, v/v), vazão de 1mL/min e detecção em 302 nm. Os picos com o tempo de 4,578; 8,376; 11,248; 16,842 min PI, OME OMES correspondem а HOME, е respectivamente. 44 Figura 1.4: Eficiência do processo de extração do OME, HOME e OMES por LLE em amostras de plasma. O eixo Y representa a porcentagem de recuperação do OME após LLE em relação ao controle (não extraído - controle = 100%), e o eixo X os solventes orgânicos avaliados. 46 Figura 1.5: Avaliação da LLE assistida por vórtex (A) e mesa agitadora (B) para extração do OME e metabólitos em amostras de plasma em diferentes tempos. O eixo Y representa a porcentagem de recuperação do OME após LLE e o eixo X os diferentes tempos avaliados. 46 Figura 1.6: Cromatogramas referentes à análise de OME e seus metabólitos em

amostras de plasma após procedimento de extração por LLE, onde A representa plasma

branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente._____47 **Figura 1.7:** Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME, sendo HOME (4,651 min), PI (8,313 min), OME (11,472 min) e OMES (17,942 min), respectivamente no período pré

operatório. Condições cromatográficas: vide figura 1-3_____52

Capítulo II

Figura 2.1: Avanço do número de publicações utilizando a DLLME como técnica de
preparo de amostra59
Figura 2.2: Fluxograma da OS-DLLME após procedimento de pré-tratamento das
amostras de plasma66
Figura 2.3: Fluxograma da OS-DLLME após realização do pré-tratamento das amostras
de plasma com solvente orgânico67
Figura 2.4: Fluxograma referente à coleta de sangue nos pacientes, no período pré e
pós operatório que fazem uso do OME71
Figura 2.5: Espectro de massas das moléculas precursoras A) OME: m/z 346 – m/z 198
e m/z 136; B) HOME: m/z 362 – m/z 214; C) OMES: m/z 362 – m/z 150 e D) PI: m/z 370
– m/z 25272
Figura 2.6: Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME,
OMES (4,0 μg/mL) e PI (10,0 μg/mL) e, submetida à extração OS-DLLME. Onde: 6,67
min, 9,18 min, 9,63 min e 11,7 min correspondem respectivamente ao HOME, OME,
OMES e PI. Condições cromatográficas: vide tabela 2-577
Figura 2.7: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas plasmáticas
para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p<0,05). Condições da OS-
DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5,
100 μL de CHCl ₃ 80
Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-
DLLME (p<0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582

Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por
OS-DLLME, (p<0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-583
Figura 2.10: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área dos analitos. A linha
vertical define o nível de confiança de 95%85
Figura 2.11: Gráfico de superfície de resposta representando a influência das variáveis
analisadas no CCD sobre as áreas de A) OME, B) HOME e C) OMES88
Figura 2.12: Gráfico de desejabilidade com as condições otimizadas para extração do
OME e metabólitos por OS-DLLME89
OME e metabólitos por OS-DLLME89 Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME,
OME e metabólitos por OS-DLLME89 Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 μg/mL) e PI (10,0 μg/mL); B) Cromatograma de uma amostra de plasma
OME e metabólitos por OS-DLLME89 Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL); B) Cromatograma de uma amostra de plasma real de paciente, coletada 150 minutos após a administração oral de 40 mg de OME e,
OME e metabólitos por OS-DLLME89 Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL); B) Cromatograma de uma amostra de plasma real de paciente, coletada 150 minutos após a administração oral de 40 mg de OME e, submetidas à extração OS-DLLME. Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,76 min e 11,5 min
OME e metabólitos por OS-DLLME. <u>89</u> Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL); B) Cromatograma de uma amostra de plasma real de paciente, coletada 150 minutos após a administração oral de 40 mg de OME e, submetidas à extração OS-DLLME. Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,76 min e 11,5 min correspondem respectivamente a HOME, OME, OMES e PI. Condições cromatográficas:

Capítulo III

Figura 3.6: Cromatograma referente à análise do IL OMImPF₆ puro (A) e extração do OME e metabólitos em plasma (B) em solução padrão (10µg/mL). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2. Em B os picos com o tempo de 18,7; 20,0; 20,8; 21,1 min correspondem a OME, OMES, PI e OS respectivamente._____113 Figura 3.7: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de BMImPF₆._____115 Figura 3.8: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de BMImPF₆._____115 Figura 3.9: Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de BMImPF₆._____116 Figura 3.10: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de HMImPF₆._____116 **Figura 3.11:** Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de HMImPF₆. 117 **Figura 3.12:** Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de HMImPF₆. 117 Figura 3.13: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de OMImPF₆._____118 Figura 3.14: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de OMImPF₆._____118 Figura 3.15: Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de OMImPF₆._____119 Figura 3.16: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas plasmáticas e solventes dispersores para extração do OME e metabólitos por IL-DLLME. Condições da IL-DLLME: 500 µL solvente dispersor, 2,5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de cada IL._____120 Figura 3.17: Influência do tipo de IL sintetizado na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME, Solvente dispersor: ISO. C₁₂PF₆ foi significativo em relação ao C₈CI, C₁₀CI e C₁₂Cl, (*p*< 0,001). Condições cromatográficas: vide tabela 3-1._____121 Figura 3.18: Influência do IL sintetizado na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME (p< 0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 3-1._____122 Figura 3.19: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em plasma. Solvente extrator: IL C₁₂PF₆ Condições cromatográficas: vide tabela 3-1.Os picos com o tempo de 19,7; 23,9; 24,8 e 28,9 min correspondem a OME, OMES, PI e OS 122 respectivamente. Figura 3.20: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em plasma. Solvente extrator: IL C₈PF₆, pH 9. Condições cromatográficas: vide tabela 3-1. _____ 124 **Figura 3.21:** Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆._____125 **Figura 3.22:** Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆._____126

Figura 3.23: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆	126
Figura 3.24: Espectro de RMN de ¹³ C(1400 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆	127
Figura 3.25: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆	127
Figura 3.26: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆	128
Figura 3.27: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e meta	bólitos por IL-
DLLME em plasma. Condições cromatográficas: vide tabela 3-1	130

Lista de tabelas

Tabela 1: Métodos descritos na literatura para quantificação de OME em	diferentes
matrizes biológicas (2017-2006)	11
Tabela 2: Aplicações dos ILs na DLLME em diferentes matrizes (2017-2008)	18
Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos ILs	20

Capítulo I

Tabela 1.1: Concentrações plasmáticas do OME e metabólitos.	_39
Tabela 1.2: Condições de extração para análise do OME e seus metabólitos em plas	sma
por LLE	_47
Tabela 1.4: Linearidade do método para análise do OME e de seus metabólitos plasma.	em _49
Tabela 1.5 : Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise	e de
OME, por LLE	_50
Tabela 1.6: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise	e de
HOME, por LLE	_50
Tabela 1.7: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise	e de
OMES, por LLE	_50
Tabela 1.8: Estabilidade das soluções padrão de OME, HOME e OMES.	_52

Capítulo II

Tabela	2.1: F	atores e níve	eis da matri	z de PB				68
Tabela Tabela	2.2: F 2.3: P	atores e níve arâmetros e	eis aplicado stabelecido:	s no CCD. s para aná	lise de OME	E, HOME	, OMES e l	68 PI por LC-
MS/MS	em ES	SI+ no modo	de aquisiçã	o MRM				74
Tabela	2.4: P	arâmetros ir	nstrumentais	s avaliados	s para anális	se de Ol	ME, HOME	, OMES e
PI	por	LC-MS/M	S em	ESI+	no	modo	de	aquisição
MRM								75
Tabela	2.5: (Condições ci	omatográfic	cas para c	leterminação	o do ON	1E, HOME,	OMES e
PI								76
Tahala	\mathbf{a}							
Tapela	2.6: S	oluções tam	pão testada	s na faixa	de pH 7-12.			81
Tabela	2.6: S 2.7:	oluções tam Coeficiente	pão testada es do mod	s na faixa delo de	de pH 7-12. superfície	de resp	oosta para	81 a a OS-
Tabela Tabela DLLME	2.6: S 2.7:	oluções tam Coeficiente	pão testada es do mod	s na faixa delo de	de pH 7-12. superfície	de resp	oosta para	81 a a OS- 87
Tabela DLLME Tabela	2.6: S 2.7: 2.8:	oluções tam Coeficiente Condições	pão testada es do moc otimizadas	s na faixa delo de para extr	de pH 7-12. superfície ação do O	de resp ME e n	posta para	81 a a OS- 87 0S-
Tabela DLLME Tabela DLLME	2.6: S 2.7: 2.8:	oluções tam Coeficiente Condições	pão testada es do mod otimizadas	s na faixa delo de para extr	de pH 7-12. superfície ação do O	de resp ME e n	posta para	81 a a OS- 87 89
Tabela DLLME Tabela DLLME Tabela	2.6: S 2.7: 2.8: 2.8: 2.9: L	oluções tam Coeficiente Condições Linearidade	pão testada es do mod otimizadas do método	s na faixa delo de para extr para anál	de pH 7-12. superfície ação do O ise do OME	de resp ME e n E e de s	posta para netabólitos seus metab	81 a a OS- 87 por OS- 89 pólitos em
Tabela DLLME Tabela DLLME Tabela plasma.	2.6: S 2.7: 2.8: 2.8: 2.9: L	oluções tam Coeficiente Condições inearidade	pão testada es do mod otimizadas do método	s na faixa delo de para extr para anál	de pH 7-12. superfície ação do O ise do OME	de resp ME e n E e de s	posta para netabólitos seus metab	81 a a OS- 87 por OS- 89 pólitos em 90
Tabela DLLME Tabela DLLME Tabela plasma. Tabela	2.6: S 2.7: 2.8: 2.9: L 2.9: L	oluções tam Coeficiente Condições inearidade Precisão e e	pão testada es do mod otimizadas do método xatidão intra	s na faixa delo de para extr para anál aensaios e	de pH 7-12. superfície ação do O ise do OME interensaic	de resp ME e n E e de s os do mé	posta para netabólitos seus metab	81 a a OS- 87 por OS- 89 pólitos em 90 análise de

 Tabela 2.11: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de HOME, por OS-DLLME._____91

 Tabela 2.12: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de OMES, por OS-DLLME._____91

 Tabela 2.13:
 Efeito matriz (n=5) do método analítico para análise de OME, HOME,

 OMES e PI.
 ______91

Tabela2.14:EstabilidadedassoluçõespadrãodeOME,HOMEeOMES.______92

 Tabela 2.15:
 Estabilidade do método para análise de OME, HOME e OMES por

 DLLME._______93

Tabela 2.16: Características dos pacientes avaliados.

Tabela 2.17: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de pacientessubmetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A(0 min), B (15min), C (30 min), D (60 min) e E (90 min). Todos os pacientes são do sexofeminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal).94Tabela 2.18: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de pacientes

submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A (0 min), B (15min), C (30 min), D (60 min) e E (90 min). Todos os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal). _____ 95

Tabela 2.19: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A (0 min), B (15min), C (30 min), D (60 min) e E (90 min). Todos os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal)._____95

Capítulo III

Tabela 3.1: Condições cromatográficas para determinação do OME, OM	MES, PI e
OS	110
Tabela 3.2: Soluções tampão avaliadas na faixa de pH 7-11	123
Tabela 3.3: Soluções tampão testadas para extração do OME por IL-DLLME.	129

94

Lista de Abreviaturas

ACE: acetona

ACN: acetonitrila

C₂Cl₄: tetracloroetileno

C₆H₅CI: clorobenzeno

CCD: delineamento composto central

CCI4: tetracloreto de carbono

CH2Cl2: diclorometano

CHCI3: clorofórmio

CQA: controle de qualidade de concentração alta

CQB: controle de qualidade de concentração baixa

CQM: controle de qualidade de concentração média

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo

DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, dispersive liquid-liquid

microextraction

DoE: delineamento de experimentos, do inglês, design of experiments

DPR: desvio padrão relativo

EF: fator de enriquecimento, do inglês, enrichment factor

EPR: erro padrão relativo

ESI: do inglês, eletrospray

ETOH: etanol

FM: fase móvel

FMN: fator de matriz normalizado

HCFMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HOME: 5-hidroxiomeprazol

HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta, do

inglês, high performance liquid chromatography

IL: líquido iônico, do inglês, ionic liquid

IL-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico, do inglês, ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction

IMC: Índice de massa corpórea

ISO: álcool isopropílico

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês,

liquid chromatography-mass spectrometry

LIQ: Limite inferior de quantificação

LLE: extração líquido-líquido, do inglês, liquid-liquid extraction

LOF: do inglês, lack of fit

LSQ: limite de quantificação superior

MEOH: metanol

MRM: monitoramento de reações múltiplas, do inglês, multiple reaction monitoring

MTBE: éter metil-terc-butílico, do inglês, ethyl tert-butyl ether

NaCI: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

OME: omeprazol

OMES: omeprazol sulfona

OS: omeprazol sulfido

OS-DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva com solvente orgânico, do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*

PB: Plackett-Burman

PPT: Precipitação de proteínas

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RSM: modelo da superfície de resposta, do inglês, response surfase methodology

SPE: extração em fase sólida, do inglês solid-phase extraction

Sumário	

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xii
Introdução	
1.1Omeprazol (OME)	7
1.2 Procedimentos de preparo de amostra	12
1.2.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	13
1.2.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico (IL-	
DLLME)	16
1.3 Delineamento experimental	21
1.4 Quantificação do OME e metabólitos em amostras de pacientes	_23
Objetivos	
Objetivo geral	_27
Objetivos específicos	27
Capítulo I	
Resumo	31
Abstract	32
1. Introdução	33
Objetivos	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. Material, Casuística e Métodos	34
3.1 Equipamentos	34
3.2 Reagentes e solventes	35
3.3 Coluna e condições cromatográficas para análise do OME e metabólitos_	35
3.4 Soluções padrão de OME e metabólitos e padrão interno	35

3.5 Amostras de Plasma	36
3.6 LLE	36
3.7 Validação do método analítico	37
3.7.1 Seletividade	38
3.7.2 Efeito residual (carryover)	38
3.7.3 Linearidade	39
3.7.4 Precisão e exatidão	40
3.7.5 Estabilidade	40
3.8 Aplicação do método	42
3.9 Análise dos dados e cálculos	43
4. Resultados e discussão	43
4.1 Determinação das condições analíticas	43
4.2 Padrão interno (PI)	44
4.3 LLE	45
4.4 Validação do método analítico	48
4.4.1 Seletividade	48
4.4.2 Efeito residual (carryover)	48
4.4.3 Linearidade	48
4.4.4 Precisão e exatidão	49
4.4.5 Estabilidade	50
4.4.6 Determinação do OME e metabólitos em amostras de	plasma de pacientes
submetidos à cirurgia bariátrica	52
5.0 Conclusões	54
Capítulo II	
Resumo	57
Abstract	58
2.1 Introdução	59
2. Objetivos	61
2.1 Objetivo geral	61
2.2 Objetivos específicos	61

Material, Casuística e Métodos 62 3.1 Equipamentos _____62 3.2 Reagentes e solventes _____62 3.3 Avaliação das condições cromatográficas por LC-MS/MS_____63 3.4 Soluções padrão de OME e metabólitos e PI_____64 3.5 Amostras de Plasma 64 3.6 Procedimento de pré-tratamento de amostra __64 3.6.1 Avaliação da temperatura_____ 64 ___65 3.6.2 Avaliação da alteração do pH e da força iônica_____ 3.6.3 Avaliação da ultrafiltração______65 3.6.4 Avaliação de solventes orgânicos _____66 3.7 Delineamento experimental _____67 3.7.1 Determinação da condição ótima de extração______68 3.7.1 Validação do método analítico_____69
 3.8 Aplicação do método ______
 70
 3.9 Análise dos dados e cálculos _____ 71 4. Resultados e Discussão 71 4.1 Avaliação das condições cromatográficas por LC-MS/MS_____71 4.2 Procedimento de pré-tratamento de amostra_____77 4.2.1 Avaliação da temperatura 77 4.2.2 Avaliação do pH e da força iônica____ 78 4.2.3 Avaliação da Ultrafiltração_____ 78 4.2.4 Avaliação de solventes orgânicos ______79 4.3 OS-DLLME 80 4.3.1 Efeito do pH_____ 80 4.3.2 Efeito do solvente extrator 82 4.4 Avaliação dos parâmetros que influenciam na eficiência da OS-DLLME usando delineamento experimental _____ 83 4.4.1 Seleção da condição ótima de extração_____85 4.5 Validação do método analítico ______ 90

4.5.1 Linearidade	_90					
4.5.2 Precisão e Exatidão	90					
4.5.3 Efeito Matriz	91					
4.5.4 Efeito carry-over	92					
4.5.5 Estabilidade das amostras	92					
4.6 Aplicação do método	93					
5.0 Conclusões	97					
Capítulo III						
Resumo	_100					
Abstract	_101					
3.1 Introdução	_102					
2. Objetivos	_105					
2.1 Objetivo geral	_105					
2.2. Objetivos específicos	_105					
3. Material, Casuística e Métodos	_105					
3.1 Equipamentos	_105					
3.2 Reagentes e solventes	_106					
3.3 Condições cromatográficas	_106					
3.4 Soluções padrão de OME e metabólitos e padrão interno	_107					
3.5 Amostras de Plasma	_107					
3.6 Avaliação de ILs comerciais	_107					
3.7 Avaliação de IL sintetizados	_107					
3.8 Extração por IL-DLLME	_109					
3.9 Avaliação dos ILs por espectroscopia por ressonância magnética nuclear						
(RMN)	_110					
4. Resultados e Discussões	_110					
4.1 Determinação das condições analíticas	_110					
4.2 Avaliação dos ILs comerciais						
4.2.1 Seleção do solvente dispersor	_111					
4.2.2 Seleção do IL comercial						

4.2.3 Avaliação os ILs comerciais por RMN					
4.3 Avaliação dos ILs sintetizados	119				
4.3.1 Seleção do solvente dispersor	119				
4.3.2 Seleção do IL sintetizado	120				
4.3.3 Avaliação da influência do pH e composição da solução tampão	123				
4.3.4 Avaliação os ILs sintetizados por RMN	124				
4.3.4 Avaliação da influência da composição da solução tampão	129				
4.3.4 Teste de linearidade	131				
4.4 Comparação entre IL comercial e IL sintetizado	131				
5.0 Conclusão	132				
Conclusão finál	136				
Referências Bibliográficas	139				

Anexos

"Os que encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino".

Leonardo da Vinci

INTRODUÇÃO

1.1 Omeprazol (OME)

O OME é o segundo fármaco mais utilizado no mundo. É empregado no tratamento de curto e longo prazo de diferentes desordens gastrointestinais (ASTRAZENECA, 2014). Foi sintetizado em 1979 e deu início a nova geração dos inibidores da bomba de prótons (IBP) que atuam inibindo seletivamente a enzima H⁺/K⁺ ATPase (LAUDANNA, 2001). É um pró-fármaco administrado oralmente na forma de grânulos com revestimento entérico resistente ao ácido estomacal e encapsulado em um invólucro gelatinoso (HERIF; OHAMED; ARDICY, 2006). Os grânulos, livres da cápsula gelatinosa, dissolvem-se no pH alcalino do intestino delgado onde é absorvido (BHARATHI et al., 2009; AHMED; ATIA, 2015a; KALATE BOJDI et al., 2015). No meio ácido dos canalículos intracelulares das células parietais, o OME se converte à sua forma ativa, uma sulfonamida reativa, que se liga de forma específica, reversível e covalentemente à bomba de prótons presente na membrana secretora das células parietais (Figuras 1 e 2). Assim, promove a inibição efetiva tanto da secreção basal quanto da estimulada de ácido gástrico, independentemente da natureza do estímulo à célula (MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2007; SHARMA et al., 2015).





Fonte: Adaptado de LOURENÇO et al., (2010). Reproduzido com permissão de LOURENÇO et al., (2010). Copyright Sociedade Brasileira de Química SBq.



Figura 2: Ativação do pró-fármaco no canalículo da célula parietal e inibição da bomba de prótons.

Fonte: Adaptado de DAL-PAZ et al., (2008). Reproduzido com permissão de DAL-PAZ et al., (2008). Copyright Editora Moreira Jr.

O OME é completamente metabolizado no fígado pelo complexo do citocromo (CYP) P450, principalmente por hidrólise, gerando três metabólitos principais. A isoforma polimórfica CYP2C19 gera o primeiro e principal metabólito plasmático, 5-hidroxiomeprazol (HOME), enquanto que a isoforma CYP3A4 gera o segundo metabólito, omeprazol sulfona (OMES) e o terceiro metabólito, gerado em menor quantidade, omeprazol sulfido (OS) (Figura 3). Tanto o OME como seus metabólitos são completamente eliminados pela urina (80%) e pelas fezes (CASS et al., 2003; HOFMANN et al., 2006; REZK; BROWN; KASHUBA, 2006; SHIMIZU et al., 2006a).

Figura 3: Principais metabólitos do OME



Fonte: Adaptado de (HOFMANN et al., 2006). Reproduzido com permissão de (HOFMANN et al., 2006). Copyright Elsevier.

O OME é uma base fraca e lábel em meio ácido com dois valores de pKa: 4,2 e 9,0 e fórmula molecular C₁₇H₁₉N₃O₃S (ESPINOSA BOSCH et al., 2017). É rapidamente absorvido após administração oral e atinge a concentração plasmática máxima entre 0,5 a 2,0 horas e a absorção intestinal é completada entre 3 a 6 horas. A biodisponibilidade absoluta é dependente da dose e do pH gástrico. Após administração de uma dose única de 40 mg, via oral, as concentrações plasmáticas variam entre 300-600 ng/mL. Apresenta volume aparente de distribuição de 0,3 L/kg de peso corpóreo, meia vida de eliminação plasmática entre 40-60 minutos e depuração plasmática total entre 30-40 L/h. É altamente ligado às proteínas plasmáticas (> 95%) como o lansoprazol e pantoprazol, fármacos da mesma classe dos IBP (MACEK; KLÍMA; PTÁČEK, 2007; BHARATHI et al., 2009; VITTAL et al., 2009).

É amplamente utilizado no tratamento de refluxo gastroesofágico, principalmente, em pacientes que sofrem de obesidade e sobrepeso no período anterior e posterior à cirurgia bariátrica. Uma das consequências da cirurgia bariátrica é o comprometimento da absorção de nutrientes e medicamentos devido ao emprego de técnicas restritivas e disabsortivas, ou seja, o paciente consegue se alimentar, porém a absorção é reduzida (ALVES, 2006). Inúmeros trabalhos clínicos apresentam dados importantes que mostram a ineficiência no mecanismo de ação de alguns fármacos administrados após a realização da cirurgia, como

OME, ranitidina, paracetamol, amoxicilina, posaconazol, além de muitos outros fármacos (AZRAN et al., 2016; GESQUIERE et al., 2016). Em relação ao OME ainda não há um consenso da dose a ser administrada nos pacientes após a intervenção cirúrgica para se alcançar a concentração plasmática e obter a ação terapêutica desejada. Assim, a determinação das concentrações plasmáticas do OME em fluídos biológicos é de grande importância clínica, uma vez que a dose poderá ser ajustada de acordo com a concentração plasmática do paciente, evitando doses subterapêuticas, o que aumentaria a probabilidade do desenvolvimento de úlceras e do retorno do refluxo gastroesofágico (HAMPEL et al., 2005).

Vários são os métodos descritos na literatura para análise do OME em matriz biológica, como pode ser observado na tabela 1, sendo os principais usando como técnica de preparo de amostra a extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid-Phase Extraction*), e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês,*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) (GHASSABIAN et al., 2009; SHIOHIRA et al., 2011; LIN et al., 2013; AHMED; ATIA, 2015a).

Matriz	Extração	Técnica	Limite de	Volume deamostra	Referência
biológica	_	Analítica	quantificação		
Plasma		HPLC-UV			(QADIR et al., 2017)
Soro		LC-MS/MS	10 ng/mL		(MITROV-WINKELMOLEN et al., 2016)
Soro	PPT	LC-MS/MS	0,025 ng/mL	100 µL	(PURIS et al., 2016)
Plasma	PPT	HPLC-UV	10 ng/mL	150 µL	(NAZIR et al., 2015)
Plasma	PPT	UPLC-MS/MS	2 ng/mL	100 µL	(MA et al., 2015)
Plasma	LLE	HPLC-UV	20 ng/mL	1000 µL	(AHMED; ATIA, 2015a)
Plasma	SPE	LC-MS/MS	1,5 ng/mL	200 µL	(WOJNICZ et al., 2015)
Plasma	SPE	LC-MS/MS	1 ng/mL	300 µL	(TANAKA et al., 2014)
Plasma	SPE	HPLC-DAD	50 ng/mL	100 µL	(LIN et al., 2013)
Plasma	LLE	LC-MS/MS	0,05 ng/mL	450 µL	(OH et al., 2012)
Plasma	LLE	HPLC-UV	5 ng/mL	1000 µL	(SHIOHIRA et al., 2011)
Plasma	SPE	LC-MS/MS	1,145 ng/mL	100 µL	(PEPPER, 2011)
Plasma	SPE	UPLC-MS/MS	2,0 ng/mL	500 µL	(GAL et al., 2010)
Plasma	LLE	HPLC-UV	20 ng/mL	1000 µL	(NOUBARANI et al., 2010)
Plasma	LLE	LC-MS/MS	5 ng/mL	300 µL	(DE SMET et al., 2010)
Plasma		HPLC-UV	20 ng/mL		(FANG et al., 2009)
Plasma	LLE	HPLC-UV	20,61 ng/mL	500 µL	(BHARATHI et al., 2009)
Plasma	SPE	LC-MS/MS	7,8 ng/mL		(GHASSABIAN et al., 2009)
Plasma	LLE	LC-MS/MS	0,05 ng/mL	300 µL	(VITTAL et al., 2009)
Soro	SPE	LC-MS/MS	1 ng/mL	250 µL	(MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2007)
Plasma	PPT	LC-MS/MS	1,2 ng/mL	250 µL	(MACEK; KLÍMA; PTÁČEK, 2007)
Plasma	LLE	HPLC-UV	3 ng/mL	1000 µL	(SHIMIZU et al., 2006b)
Plasma	LLE	HPLC-DAD	2,0 ng/mL	200 µL	(REZK; BROWN; KASHUBA, 2006)
Plasma		HPLC	10 ng/mL		(ZARGHI et al., 2006)
Plasma	PPT	HPLC-UV	0,01 µg/mL	150 µL	(JIA; LI; ZHAO, 2006)
Plasma	LLE	LC-MS/MS	10 ng/mL	250 μL	(HOFMANN et al., 2006)
Plasma	LLE	HILIC-MS/MS	2,5 ng/mL	50 µL	(SONG; NAIDONG, 2006)
Plasma	SPE	CE	0,07 µg/mL	1000 µL	(PÉREZ-RUIZ et al., 2006)

Tabela 1: Métodos descritos na literatura para quantificação de OME em diferentes matrizes biológicas (2017-2006).

Fonte: Própria autoria.

1.2 Procedimentos de preparo de amostra

O preparo de amostra é uma das etapas mais importantes dos métodos analíticos. Entretanto é a etapa que demanda maior tempo do processo analítico (cerca de 80%) e exige conhecimento do analista, especialmente quando aplicada a amostras biológicas (JARDIM, 2010). Técnicas instrumentais muitas vezes não são sensíveis o suficiente para detectar o analito diretamente nas amostras biológicas e os resultados são comprometidos por contaminantes da matriz. Assim, é fundamental o isolamento do composto de interesse a partir da amostra, pois minimiza ou elimina os efeitos da matriz e contaminantes, melhorando os limites de detecção e a sensibilidade da técnica para vários analitos, além de tornar a amostra compatível com a instrumentação analítica (XIAO-HUAN et al., 2009; REZAEE et al., 2010; ESCUDERO et al., 2013). Assim, na etapa de preparo de amostra é possível a otimização dos métodos para obtenção de resultados adequados, precisos e com boa detectabilidade (RODRIGUES; DA SILVA; DO CARMO HESPANHOL DA SILVA, 2010).

Até o momento, apenas técnicas tradicionais de preparo de amostra foram usadas para quantificação do OME em matriz biológica (Tabela 1), como a LLE, técnica, gold standard. A LLE é a técnica predominante de extração empregada no processamento de amostras biológicas para quantificação do OME e seus metabólitos. É uma técnica de simples execução que pode ser aplicada com uso de diferentes solventes. Além de ser considerada a técnica padrão para extração do OME em plasma. Entretanto, esta técnica, apesar da simplicidade de execução apresenta algumas desvantagens. A LLE apresenta tendência à formação de emulsão, há impossibilidade de automação, envolve vários passos, necessita de um longo tempo para concentração das amostras, não é seletiva e também há o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos de alta pureza e de elevado custo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; CASSOL, 2007; BEHBAHANI et al., 2013). Enquanto que a SPE, segunda técnica mais empregada, utiliza cartuchos caros, não reutilizáveis, além de apresentar problemas de reprodutibilidade dos mesmos devido às diferenças do material adsorvente, emprego de grandes quantidades de solvente e da possibilidade de entupimento quando empregados na análise de amostras biológicas (JARDIM, 2010; MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011).

Assim, devido às desvantagens das técnicas mais tradicionais de preparo de amostra, as pesquisas nesta área têm sido focadas em melhorar esta etapa analítica com o intuito de simplificar, miniaturizar e automatizar esse procedimento, além de utilizar menores quantidades de amostras para atingir uma maior seletividade na extração.

Outra questão em foco é a redução do consumo de solventes orgânicos tóxicos e desenvolvimento de procedimentos menos danosos ao meio ambiente com menor desperdício, porém sem perder o compromisso com a eficiência de extração (LENARDÃO; DABDOUB; BATISTA, 2003; MARTINS et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2008).

Neste contexto, nos últimos anos as técnicas de microextrações em fase líquida (LPME, do inglês, *liquid-phase microextraction*) vêm ganhando espaço no cenário da química analítica, entre elas: a microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *single 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*) (DE OLIVEIRA et al., 2008).

1.2.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi proposta por (REZAEE et al., 2006) para extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água. Consiste no equilíbrio de distribuição do analito em um sistema ternário de solventes composto pela fase doadora aquosa (amostra), solvente dispersor e fase aceptora (solvente extrator). Este tipo de extração é aplicável para compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de distribuição modificado pelo controle do pH (analitos ácidos ou básicos) (XIAO-HUAN et al., 2009). A razão entre o volume da fase aceptora e fase doadora é na faixa volumétrica de microlitros e mililitros, respectivamente, o que possibilita o alto enriquecimento por utilizar reduzidos volumes (BOSCH OJEDA; SÁNCHEZ ROJAS, 2009; TALEBIANPOOR et al., 2014), e o estado de equilíbrio é rapidamente atingido devido ao emprego de um sistema ternário de solventes (amostra aquosa, solvente dispersor e solvente extrator) (XIAO-HUAN et al., 2009; REZAEE et al., 2010).
O solvente extrator deve ser escolhido com base em sua densidade, que deve ser superior à da água, ser insolúvel nesta, e ser capaz de extrair o composto de interesse. Os solventes extratores mais empregados são os hidrocarbonetos halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno, devido à alta densidade (REZAEE et al., 2010; LEONG; FUH; HUANG, 2014; YAN et al., 2014). Dentre os solventes não halogenados também podem ser utilizados o undecanol, 1-dodecanol, 2-dodecanol e n-hexadecano (BOSCH OJEDA; SÁNCHEZ ROJAS, 2009). O volume utilizado definirá o fator de pré-concentração/ enriquecimento (MARTINS et al., 2012; XIAO et al., 2013). A DLLME executada com uso de solventes orgânicos como solventes extratores é nomeada OS-DLLME (do inglês, *Organic Solvent – Dispersive Liquid Liquid Microextraction*).

Em relação ao solvente dispersor, este precisa ser solúvel tanto na fase doadora quanto na fase aceptora, o que possibilita a dispersão do solvente extrator em finas gotículas na fase aquosa. Assim, a área superficial do solvente extrator em contato com a fase aquosa, que contém o analito de interesse, é infinitamente grande o que aumenta a eficiência da extração (XIAO et al., 2013). Os solventes dispersores mais utilizados são a ACE, ACN, ETOH, ISO, MEOH e tetrahidrofurano (XIAO-HUAN et al., 2009; YAN et al., 2014). O volume do solvente dispersor afeta a formação das gotículas e consequentemente o grau de dispersão do solvente de extração e a eficiência da extração (REZAEE et al., 2010).

A figura 4 mostra o sistema ternário de solventes, no qual o solvente extrator e o solvente dispersor são rapidamente injetados na amostra aquosa com o auxílio de uma microsseringa (1). É formada uma dispersão turva (mistura ternária) após a injeção (2). A mistura é centrifugada e as gotículas do solvente extrator (mais denso) se depositam no fundo do tubo cônico (3) e são recolhidas com uma microsseringa para posterior análise (4) (REZAEE et al., 2006; FERNÁNDEZ et al., 2013; HO et al., 2014).

Figura 4: Extração por DLLME



Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 2013). Reproduzido com permissão de (ZHANG et al., 2013). Copyright Elsevier.

A eficiência da extração por DLLME pode ser afetada principalmente pelo tipo e volume dos solventes dispersor e extrator utilizados, o pH da amostra e a presença ou adição de sais e modificadores químicos (BERIJANI et al., 2006; REZAEE et al., 2006). A presença dos sais e a força iônica por eles exercida influenciam na separação das fases aquosa e extratora. A adição de sal ocasionará no aumento do volume da fase sedimentada, visto que o sal diminui a solubilidade do solvente extrator na fase aquosa, além de aumentar a densidade da fase aquosa. O sal também melhora a recuperação da extração pela diminuição da solubilidade do analito na fase aquosa (MARTINS et al., 2012; NAGESWARA RAO; MASTAN VALI; VARA PRASADA RAO, 2012).

O fator de enriquecimento (EF, do inglês *efficiency factor*) é calculado pela razão entre a concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração inicial do analito na fase aquosa (C_0) (Equação 1), enquanto que a recuperação da extração é calculada pela equação 2, onde (N_0) é a porcentagem de analito total, (N_{sed}) a porcentagem de analito extraído no sedimento, (V_{sed}) o volume da fase sedimentada e (V_{aq}) o volume inicial da amostra (REZAEE et al., 2010).

Equação (1)
$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

Equação (2) $ER = \frac{N_{sed}}{N_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100$

Esta técnica oferece muitas vantagens como: baixo tempo de extração, simplicidade de execução, rapidez, baixo custo, alta recuperação e alto EF do analito e pouco consumo de solventes (REZAEE et al., 2010; SUH et al., 2013; ZHANG et al., 2013). As desvantagens incluem: a extração ser totalmente manual e necessitar da etapa de centrifugação, o que prolonga sua execução e a dificuldade em selecionar um solvente extrator que atenda a todos os requisitos citados. A maioria dos solventes extratores disponível são solventes halogenados, altamente tóxicos que geram resíduos perigosos e não-biodegradáveis no ambiente. Portanto, é fundamental a busca e utilização de solventes alternativos, renováveis e não-tóxicos (LENARDÃO; DABDOUB; BATISTA, 2003; BERIJANI et al., 2006; SUH et al., 2013).

1.2.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico (IL-DLLME)

Na tentativa de desenvolver a DLLME empregando solventes alternativos aos orgânicos tóxicos, (LIU et al., 2009) apresentaram uma nova vertente da DLLME, a IL-DLLME (do inglês, *lonic liquid dispersive liquid-liquid microextraction*). Na IL-DLLME há a utilização de líquidos iônicos em substituição aos solventes orgânicos, em sua maioria halogenados e tóxicos, utilizados na extração por DLLME, assim o que difere a OS-DLLME da IL-DLLME é o uso de líquidos iônicos como solventes extratores em substituição aos solventes orgânicos.

O primeiro líquido iônico (IL, do inglês, *Ionic Liquid*) desenvolvido foi o nitrato de etilamônio [EtNH₃][NO₃], com ponto de fusão de 12 °C. Este IL foi sintetizado pelo químico russo Walden, durante a 1ª Guerra Mundial, 1914. Contudo, somente nos últimos anos os ILs ganharam maior notoriedade, devido às recentes pesquisas sobre suas propriedades físico-químicas (MARSH; BOXALL; LICHTENTHALER, 2004; BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2008; HO et al., 2014)

Os ILs são sais fundidos à temperatura ambiente, formados totalmente por íons, sendo estes, cátions orgânicos em associação com ânions orgânicos ou inorgânicos que podem ser substituídos proporcionando propriedades físicoquímicas únicas. No geral os ILs são atóxicos, não inflamáveis, não corrosivos, possuem pressão de vapor desprezível, volatilidade extremamente baixa, alta condutividade devido à composição exclusivamente de íons móveis e larga janela eletroquímica, ou seja, não sofre processo de oxidação ou redução (HAN; ROW, 2010; SATO, 2011; ZHAO et al., 2011).

Existem várias combinações possíveis de cátions e ânions e cada associação gera propriedades específicas. A seleção do cátion constituinte determina a viscosidade, tensão superficial, solubilidade e densidade do líquido iônico, uma vez que são características que dependem do comprimento da cadeia alquila do cátion, bem como, de sua forma ou simetria. Assim, o aumento da cadeia alquílica leva à diminuição da densidade e aumento da viscosidade e hidrofobicidade, enquanto que a escolha do ânion define sua estabilidade térmica e química e miscibilidade em água e solventes moleculares (LIU et al., 2003; LIU; JIANG; JÖNSSON, 2005; BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2008; HAN; ROW, 2010).

Os ILs são aplicados em extrações na indústria farmacêutica, biomédica, química, de alimentos e ambiental. Podem ainda ser empregados como aditivos de fase móvel (FM) em cromatografia líquida, como fase estacionária ligado à superfície e como apoio em membranas líquidas (HAN; ROW, 2010; ZHANG et al., 2013). A tabela 2 apresenta alguns exemplos de métodos de extração desenvolvidos que utilizaram ILs como solvente extrator, na IL-DLLME, para a quantificação de diferentes analitos como ésteres ftalato, PAHs, benzonidazol, pesticidas, inseticidas, metais, além de outros importantes analitos (HAN; ROW, 2010; RAO; RAJU; VALI, 2013).

Tabela 2: Aplicações dos II s na DLLME em diferentes matrizes	(2017 - 2008)

Matriz	Analito	Técnica de extração	Solvente Extrator (Líquido iônico)	Solvente dispersor	Técnica analítica	Referência
Sangue	Benzodiazepínicos	IL-DLLME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Sem SD	LC- MS/MS	(DE BOECK et al., 2017a)
Urina	3-hidroxibenzo[3]pireno	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Acetona	HPLC- HRMS/MS	(HU et al., 2016)
Plasma	Atenolol	IL-UA-ISFME	[C ₄ MIM][BF ₄]	Sem SD	HPLC-UV	(ZEEB; FARAHANI; PAPAN, 2016)
Soro	Danazol	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Sem SD	HPLC-UV	(GONG; ZHU, 2016)
Soro	Acetado de ulipristal	UA- IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Sem SD	HPLC-UV	(GONG; ZHU, 2015)
Bebidas alcóolicas	Ésteres de ftalato	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Etanol	HPLC- DAD	(FAN; LIU; XIE, 2014)
Água	PAHs	SPE-IL-DLLME	[C ₄ MIM][Tf ₂ N]	Acetona	HPLC-UV	(LIU et al., 2014)
Urina	Anetola, estragola e para- anisaldeído	IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Acetona	HPLC-UV	(RAJABI et al., 2014)
Soro	Saquinavir	IL-DLLME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC- DAD	(RAMISETTI; NIMMU; CHALLA, 2014)
Soro	5-hidroxindolas	IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC-UV	(HAYAMA et al., 2013)
Sangue seco	Salmeterol	IL-DLLME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC-UV	(HATAMI; KARIMNIA; FARHADI, 2013)
Urina	Irbesartan e valsartan	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Acetona	HPLC-UV	(LI et al., 2013)
Plasma	Benzonidazol e nifurtimox	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC-UV	(PADRÓ et al., 2013)
Soro	Anti-hipertensivos	IL-DLLME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Acetona	HPLC-UV	(RAO; RAJU; VALI, 2013)
Plasma	Sildenafila, vardenafila e aildenafila	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC-UV	(XIAO et al., 2013)
Urina	Emodina e metabólitos	IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Acetonitrila	HPLC-UV	(TIAN; CHEN; BAI, 2012)
Soro	Rifaximina	IL-DLLME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC- DAD	(NAGESWARA RAO; MASTAN VALI; VARA PRASADA RAO, 2012)
Urina	Celastrol	UA-IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC- PAD	(SUN; SHI; CHEN, 2011)

Água, leite, plasma e mel	Sulfonamidas	IL-MADLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC-UV	(XU et al., 2011)
Água	Pesticidas piretroides	IL-DLLME	[C ₈ MIM][PF ₆]	[C ₄ MIM][BF ₄]	HPLC-UV	(ZHAO et al., 2011)
Água, urina e saliva	Cobalto	IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Metanol	ETAAS	(BERTON; WUILLOUD, 2010)
Água	Inseticidas heterocíclicos	IL-DLLME	[C ₆ MIM][PF ₆]	Metanol	HPLC- DAD	(LIU et al., 2009)
Água	Aminas aromáticas	IL-DLLME e IL-HS-LPME	[C ₄ MIM][PF ₆]	Sem SD	HPLC-UV	(FAN et al., 2008)

ETTAS: Espectrometria de absorção atômica eletrotermal; [C₆MIM][PF₆]:1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato; [C₈MIM][PF₆]: 1-octil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato; [C₄MIM][PF₆]: 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato; [C₄MIM][Tf₂N]: 1,3-dibutilimidazólio bis[(trifluorometil)sulfonil]imida. UA-IL-DLLME: Microextração líquida-líquida dispersiva assistida por ultrassom; SPE–IL-DLLME: Extração em fase sólida acoplada a microextração líquida-líquida dispersiva com líquido iônico; IL-HS-LPME: Microextração em fase líquida com líquido iônico e headspace; IL-MADLLME: Microextração líquida-líquida dispersiva assistida por micro-ondas; IL-UA-ISFME: Microextração líquida-líquida dispersiva assistida por ultrassomin situ; HPLC-HRMS: Cromatografia líquida de alta resolução acoplada com espectrometria de massas, SD: solvente dispersor.

Fonte: Própria autoria.

A tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas de alguns ILs usados como solvente extrator.

I abela 3: Propriedades físico-químicas dos ILS.					
Densidade	1,362- 1,373	1,29 -1,31	1,20 – 1,23	1,11	1,072
(g/mL) (25º C)					
Solubilidade em	18g/L	0,75 (g/100	0,20 (g/100	parcialmente	-
água		mL)	mL)		
Viscosidade	400	560 - 585	710	440	930
(25ºC)(mPas)					
Índice de	1,411	1,422	1,423 —	-	-
refração			1,4250		
Tensão	-	36,8	34,2	-	63
Superficial					
(dyn/cm, 25 °C)					
Massa molecular	284,18	312	340,29	281,8	309,8
Ponto de Fusão	6 – 10	- 61	- 40	-79	-25
(°C)					
Fórmula	$C_8H_{15}F_6N_2P$	$C_{10}H_{19}F_6N_2P$	$C_{12}H_{23}F_6N_2P$	$C_{12}H_{23}BF_4N_2$	$C_{14}H_{27}BF_4N_2$
molecular					
Cor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo	Amarelo claro	Amarelo
			médio		intenso

Fonte: Adaptado de (HUDDLESTON et al., 2001; LIU et al., 2003; LIU; JIANG; JÖNSSON, 2005; BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2008; RAO; RAJU; VALI, 2013).

Para execução tanto da técnica de extração usando a OS-DLLME quanto a IL-DLLME é necessária a avaliação de um grande número de variáveis, como volume de solvente dispersor e extrator, pH do meio, tempo de centrifugação e agitação, entre outros. Assim, um delineamento experimental foi desenvolvido para

avaliar e otimizar as condições mais adequadas para a quantificação do OME e metabólitos em material biológico, a OS-DLLME.

1.3 Delineamento experimental

A otimização das condições experimentais classicamente ocorre pela monitorização de uma única variável por vez na resposta experimental, ou seja, um parâmetro é alterado enquanto os demais são fixados. Este procedimento é nomeado de um fator a cada tempo (do inglês, *one-factor-at-a-time*). Apesar da simplicidade de execução e de possuir traços intuitivos, esta estratégia tem algumas desvantagens tais como não avaliar os efeitos interativos entre as variáveis estudadas e assim não garantir a otimização do método, além do custo elevado em relação ao tempo de execução e gasto de reagentes, pois muitas vezes é necessário um maior número de experimentos (BEZERRA et al., 2008; BORGES et al., 2009; PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009; LI et al., 2013; PETRIDIS; SAKKAS; ALBANIS, 2014). Para sanar estas desvantagens, ferramentas estatísticas estão sendo utilizadas para auxiliar na otimização de procedimentos em laboratórios de química analítica.

Inúmeros trabalhos demonstram a aplicação de um modelo da superfície de resposta (RSM, do inglês, *Response Surfase Methodology*) no desenvolvimento de métodos analíticos, cromatográficos, técnicas de extração, além de outras áreas da pesquisa (FONTÃO et al., ; TALEBIANPOOR et al., 2014; ABDULRA'UF; TAN, 2015; GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016).

A aplicação do RSM foi desenvolvida por Box e Wilson (1951). É resultado da união de três disciplinas: matemática, estatística e lógica formal, além da aplicação de ciências da computação no desenvolvimento de programas estatísticos aplicados na análise quantitativa e qualitativa (GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016). O objetivo da aplicação do RSM é obter o modelo de superfície de resposta sobre uma região de interesse em particular, a otimização da resposta e a seleção das condições ótimas. O RSM tem como base o delineamento de experimentos (DoE, do inglês, *Design of Experiments*) para o desenvolvimento, melhora e otimização de processos (BEZERRA et al., 2008; ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014).

O DoE é uma abordagem sistemática utilizada para entender como processos e parâmetros afetam as variáveis de resposta. O delineamento experimental compreende duas etapas: os delineamentos de primeira ordem e de segunda ordem. O DoE de primeira ordem abrange a fase de triagem dos fatores que influenciam a eficiência do método. Nesta fase é realizado um número mínimo de experimentos explorando o número máximo de variáreis. Nesta etapa os testes mais aplicados são o delineamento Plackett-Burman (PB), o delineamento fatorial fracionado ou o delineamento fatorial completo (TEÓFILO, 2007; BEZERRA et al., KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; ORLANDINI; 2008: GOTTI: FURLANETTO, 2014; GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016). No DoE de segunda ordem o objetivo é encontrar os fatores que otimizam a resposta. Nesta fase, os testes mais executados são o delineamento Box-Behnken, delineamento Doehlert e o delineamento composto central (CCD) por serem mais completos e, ao final, fornecerem as condições ideais para análise (TEÓFILO, 2007; LI et al., 2013; GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016).

O RSM é a técnica multivariada mais importante aplicada na otimização dos processos analíticos, porém antes de sua execução são necessárias algumas medidas: seleção das variáreis que se pretende avaliar a influência, fazer o delineamento experimental, ou seja, definir os valores mínimos e máximos que serão avaliados de cada fator e escolher o delineamento que será aplicado (Plackett-Burman, Box-Behnken, Composto central ou Doehlert) para, em seguida, executar os experimentos de acordo com a matriz estabelecida (BEZERRA et al., 2008).

Introduzido em 1946 o delineamento de PB é o primeiro passo no procedimento de otimização, além de ser uma abordagem popular e econômica que oferece informações sobre os efeitos de forma individual de cada variável no experimento, utilizando-se de poucos ensaios. Como numerosos fatores podem afetar a resposta do método avaliado, tornando praticamente impossível discernir e controlar a colaboração de cada fator para a melhor resposta é necessária a distinção das variáreis com efeitos superiores, ou seja, os modelos de triagem devem ser aplicados a fim de definir quais dos diferentes fatores experimentais e suas influências são mais significativas. O modelo de PB não determina com exatidão os valores ideais de cada variável, porém proporciona informações

valiosas sobre cada fator, com poucos experimentos, para a aplicação dos testes de segunda ordem do RSM (BEZERRA et al., 2008; PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009; KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; ABDULRA'UF; TAN, 2015).

Apresentado por Box e Wilson (1951), o CCD é o teste de segunda ordem mais utilizado devido à sua flexibilidade, capacidade de dar uma aproximação do valor real e os parâmetros podem ser facilmente identificados detalhadamente ao fim do teste. É a ferramenta que permite a otimização do método e fornece os valores ideais de cada variável. Posteriormente à execução e tratamento dos resultados é fundamental analisar se o modelo está ajustado ou se há a necessidade de mudança dos valores pré-definidos para a análise. Ao final, é possível alcançar os valores ótimos para cada variável (BEZERRA et al., 2008; ABDULRA'UF; TAN, 2015).

Assim, o delineamento experimental foi aplicado na OS-DLLME, visto que nesta técnica o número de variáveis que precisam ser avaliadas é significante como: pré-tratamento da amostra, tipo e volume de solvente dispersor, tipo e volume de solvente extrator, tempo de extração, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de solução tampão, força iônica e pH da amostra; em comparação à LLE, a técnica de extração padrão desenvolvida para extração do OME, foi realizada avaliando um parâmetro de cada vez (univariado): tipo e volume de solvente orgânico, tempo e tipo de agitação.

1.4 Quantificação do OME e metabólitos em amostras de pacientes

A determinação das concentrações plasmáticas de OME em pacientes que são submetidos à cirurgia bariátrica é de fundamental importância clínica, pois a dose ingerida diariamente deve ser ajustada caso não atinja a concentração terapêutica desejada, o que poderia aumentar os riscos de desenvolvimento de complicações pós-cirúrgicas, como úlceras e refluxo gastroesofágico. A menor concentração plasmática de fármacos pode ocorrer devido a possível influência da cirurgia na absorção de fármacos, fato que foi avaliado para ajuste de dose, uma vez que estes pacientes são usuários a longo prazo do OME (MITROV-WINKELMOLEN et al., 2016). Entretanto, ressalta-se que esta avaliação e compreensão dos mecanismos envolvidos na absorção deste fármaco nestes pacientes foram realizadas pela equipe médica do HCFMRP/USP. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método padrão para análise do OME em plasma, a LLE. Além disso, foi desenvolvida, otimizada e validada uma técnica miniaturizada de extração inédita para extração do OME e metabólitos em plasma, a OS-DLLME. A, IL-DLLME foi avaliada como técnica alternativa de extração dos analitos avaliados.

"Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada."

Immanuel Kant

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos para análise do OME e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica por HPLC e LC-MS/MS utilizando a LLE, a OS-DLLME e a IL-DLLME como técnicas de preparo de amostra.

Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise do OME e metabólitos por HPLC-UV como temperatura da coluna, vazão de fase móvel, composição da FM;
- Avaliar a LLE, técnica gold standard, para a extração do OME e metabólitos em amostras de plasma estudando os parâmetros: tipo e volume de solvente orgânico, tempo e tipo de agitação;
- Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade e seletividade;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de plasma de pacientes em tratamento com OME e submetidos à cirurgia bariátrica no HC-FMRP/USP;
- Avaliar as condições para análise do OME e metabólitos por LC-MS/MS: vazão do gás de nebulização e gás de dessolvatação, temperatura da fonte de ionização e do gás de dessolvatação, energia de colisão, voltagem do capilar;
- Avaliar a OS-DLLME como técnica de preparo de amostra miniaturizada, para a extração do OME e metabólitos em plasma por LC-MS/MS e otimizar os parâmetros: pré-tratamento da amostra, tipo e volume de solvente dispersor, tipo e volume de solvente extrator, tempo de extração, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de diluição, força iônica e pH da amostra usando um planejamento fatorial Plackett-Burman seguido do planejamento Composto central e obter a condição ótima de extração com a ferramenta de desejabilidade;
- Validar o método desenvolvido por OS-DLLME quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade, efeito matriz, e seletividade;

- Aplicar o método desenvolvido e validado da OS-DLLME em amostras de plasma de pacientes em tratamento com OME e submetidos à cirurgia bariátrica HC-FMRP/USP;
- Avaliar a IL-DLLME, como técnica de preparo de amostra inovadora e miniaturizada, para a extração do OME e metabólitos em plasma por HPLC-DAD e estudar os parâmetros: pré-tratamento da amostra, tipo e volume de solvente dispersor, tipo e volume de solvente extrator, tempo de extração, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de diluição, força iônica e pH da amostra.

"O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma." Albert Einstein

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DO OMEPRAZOL E METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Lista de Figuras

Figura 1.1: Fluxograma referente ao procedimento de extração do OME e
metabólitos em amostras de plasma por LLE37
Figura 1.2: Fluxograma referente a coleta de sangue nos pacientes submetidos à
cirurgia bariátrica que fazem uso do OME43
Figura 1.3: Cromatograma referente à determinação do HOME, OME e OMES em
solução padrão (40 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Zorbax Eclipse
XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) e coluna de guarda Zorbax Eclipse
XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm). FM: ACN: água (30:70, v/v),
vazão de 1mL/min e detecção em 302 nm. Os picos com o tempo de 4,578; 8,376;
11,248; 16,842 min correspondem a HOME, PI, OME e OMES
respectivamente44
Figura 1.4: Eficiência do processo de extração do OME, HOME e OMES por LLE
em amostras de plasma. O eixo Y representa a porcentagem de recuperação do
OME após LLE em relação ao controle (não extraído - controle = 100%), e o eixo X
os solventes orgânicos avaliados46
Figura 1.5: Avaliação da LLE assistida por vórtex (A) e mesa agitadora (B) para
extração do OME e metabólitos em amostras de plasma em diferentes tempos. O
eixo Y representa a porcentagem de recuperação do OME após LLE e o eixo X os
diferentes tempos avaliados46
Figura 1.6: Cromatogramas referentes à determinação de OME e seus metabólitos
em amostras de plasma após procedimento de extração por LLE, onde A
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas:
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES,
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente47
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente47 Figura 1.7: Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente,
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente47 Figura 1.7: Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME, sendo HOME
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente47 Figura 1.7: Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME, sendo HOME (4,651 min), PI (8,313 min), OME (11,472 min) e OMES (17,942 min),
representa plasma branco e B o plasma fortificado. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,578; 8,376; 11,248 e 16,842 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente47 Figura 1.7: Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME, sendo HOME (4,651 min), PI (8,313 min), OME (11,472 min) e OMES (17,942 min), respectivamente no período pré operatório. Condições cromatográficas: vide figura

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Concentrações plasmáticas do OME e metabólitos.	39
Tabela 1.2: Condições de extração para determinação do OME e seus metabólitos em plasma por LLE	47
Tabela 1.3: Linearidade do método para determinação do OME e de seus metabólitos em plasma.	_49
Tabela 1.4: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para determinação de OME, por LLE.	50
Tabela 1.5: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para determinação de HOME, por LLE.	_50
Tabela 1.6: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para determinação de OMES, por LLE.	50
Tabela 1.7: Estabilidade das soluções padrão de OME, HOME e OMES.	_52

Lista de Abreviaturas

CQA: controle de qualidade de concentração alta

CQB: controle de qualidade de concentração baixa

CQM: controle de qualidade de concentração média

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo

DPR: desvio padrão relativo

EF: fator de enriquecimento, do inglês, enrichment factor

EPR: erro padrão relativo

FM: fase móvel

HCFMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HOME: 5-hidroxiomeprazol

HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta, do inglês, *high performance liquid chromatography*

IMC: Índice de massa corpórea

LIQ: Limite inferior de quantificação

LLE: extração líquido-líquido, do inglês, liquid-liquid extraction

LOF: do inglês, lack of fit

LSQ: limite de quantificação superior

MTBE: éter metil-terc-butílico, do inglês, ethyl tert-butyl ether

NaCI: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

OME: omeprazol

OMES: omeprazol sulfona

OS: omeprazol sulfido

PPT: Precipitação de proteínas

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SPE: extração em fase sólida, do inglês solid-phase extraction

RESUMO

A etapa de preparo de amostra em matrizes complexas como plasma é essencial para eliminação dos contaminantes interferentes e concentração do analito. A LLE é a técnica standard gold para extração do OME e metabólitos, descrita na literatura. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento da LLE para extração do OME e seus metabólitos e aplicação em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. A determinação do OME e metabólitos foi feita em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4.6 mm, partículas de 5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), FM composta por ACN:água (30:70, v/v), na vazão de 1 mL/min, detecção em 302 nm em HPLC-UV. Nestas condições foi possível a separação do OME e metabólitos em menos de 20 minutos. A extração por LLE foi feita utilizando 500 µL de plasma, 2,5 mL de MTBE e 25 minutos de agitação em mesa agitadora, com recuperação de 82%. O método foi validado e aplicado com sucesso para análise de amostras de plasma de 20 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, no período pré e pós-cirúrgico.

ABSTRACT

A stage of sample preparation in complex matrices with plasma is essential for elimination of interfering contaminants and analyte concentration. The liquid-liquid extraction (LLE) is a gold standard technique for extraction of OME and metabolites described in the literature. Thus, the objective of this work in the development of LLE for extraction of OME and its metabolites and application in plasma samples of patients submitted to bariatric surgery. The gradient liquid chromatographic method was performed on a Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) column with column guard cartridge. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile: water (30:70, v/v) at the flow rate of 1 mL/min and wavelength set at 302 nm. Under these conditions a separation of OME and metabolites was possible in less than 20 minutes. LLE extraction was done using 500 μ L of plasma, 2.5 mL of MTBE and 25 minutes of stirring on a shaker table, with recovery of 82%. The method was validated and successfully applied for the analysis of plasma samples from 20 patients submitted to bariatric surgery period.

1. Introdução

A etapa de preparo de amostra é essencial quando se trata de amostras complexas, como as biológicas, que são caracterizadas pela elevada presença de proteínas, fosfolipídeos e lipídeos. Além disso, esta etapa possibilita a concentração das substâncias investigadas, principalmente quando estão em nível de traços na amostra. Assim, é possível isolar e concentrar o analito de interesse, além de eliminar os contaminantes interferentes de forma que se obtenha uma separação cromatográfica com boa detecção e tempo de análise aceitáveis (DE OLIVEIRA et al., 2008). Na hipótese de a amostra complexa ser injetada diretamente no sistema cromatográfico, pode ocasionar a adsorção daqueles elementos na matriz da fase estacionária o que pode acarretar perda da eficiência da coluna cromatográfica, bem como o aumento da pressão do sistema (JARDIM, 2010; REZAEE et al., 2010).

A LLE é a técnica predominante de extração empregada no processamento de amostras biológicas e baseia-se na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, a fase orgânica (solvente orgânico) e a fase aquosa (plasma ou urina). A efetividade da extração depende da afinidade do analito pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A LLE possui as vantagens de ser simples, e possibilitar o de uso de inúmeros solventes puros disponíveis que fornecem uma vasta faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, ocorre a desnaturação das proteínas presentes na amostra (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Em contrapartida, a técnica apresenta um conjunto de desvantagens, tais como: as amostras com alta hidrofilicidade são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito, as impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, necessitando o emprego de solventes ultrapuros, possibilidade de formação de emulsões. Independentemente destas desvantagens, a LLE é considerada uma técnica clássica de preparo de amostra e tem sido ainda muito aplicada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, por resultar em extratos satisfatoriamente limpos e com alta seletividade para alguns analitos, além de ser muito robusta. Sendo

assim, a LLE é considerada a técnica "gold standard" para extração do OME em amostras de plasma (BOSCH et al., 2007).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método para análise do OME e seus metabólitos (HOME e OMES) por HPLC-UV utilizando a LLE como técnica de preparo de amostra.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise do OME e metabólitos por HPLC-UV;
- Avaliar a LLE, técnica gold standard, para a extração do OME e metabólitos em amostras de plasma avaliando os seguintes parâmetros: tipo e volume de solvente orgânico, tempo e tipo de agitação;
- Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade e seletividade;
- Aplicar o método validado em amostras de plasma de pacientes em tratamento com OME e submetidos à cirurgia bariátrica no HC-FMRP/USP.

3. Material, Casuística e Métodos

3.1 Equipamentos

A análise do OME foi realizada em um cromatógrafo a líquido modelo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por uma bomba LC-20T, injetor SIL-10AF, forno CTO-10A, detector SPD-M10A, operando em 302 nm, controladora CBM-10A, desgaseificador DGU-20A5R, válvula LPGE Kit e software LC Solutions – marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Para o preparo das soluções foi empregada água ultrapura obtida do sistema Master Modelo MS 2000 (Gehaka, Brasil). A balança analítica utilizada nos procedimentos de pesagem foi da marca Sartorius, modelo MSU225P (Goettingen, Alemanha). A homogeneização das soluções foi feita em um agitador de tubos Ika (*vórtex*), modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha). Para a realização das extrações foi utilizada uma centrifuga Hitachi, modelo HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão) e mesa agitadora pendular (*shaker*) Tecnal, modelo TE 241 (Piracicaba, Brasil).

3.2 Reagentes e solventes

O OME (pureza > 98%), OMES e HOME (pureza > 95%), e fenacetina (pureza > 98%) utilizados para o preparo das soluções padrão foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

O metanol (grau HPLC) utilizado no preparo das soluções padrões e de trabalho e a acetonitrila (grau HPLC) empregada na composição da FM foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH) (Mallinckrodt Chemicals, Estado do México, México) e os solventes orgânicos acetato de etila (Mallinckrodt Baker AS, Cidade do México, México), éter metil-terc-butílico (MTBE) (JT Baker, Center Valley, EUA) (grau analítico), álcool isopropílico (Sigma, St. Louis, EUA), éter isopropílico, hexano (Tedia, Fairfield, EUA) e acetona (Macron Chemicals, Center Valley, EUA) (grau HPLC).

3.3 Coluna e condições cromatográficas para análise do OME e metabólitos

Foi utilizada a coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA).

3.4 Soluções padrão de OME e metabólitos e padrão interno

Uma solução estoque do OME e metabólitos (HOME, OMES) foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau HPLC) para cada analito. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho, contendo os três analitos em uma mesma solução, nas concentrações de 0,8; 1,6; 4,0; 8,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/mL, também em metanol (grau HPLC). A fenacetina, utilizada como padrão interno (PI), foi preparada na concentração de 1 mg/mL como solução estoque em metanol e a solução de trabalho na concentração de 100 µg/mL também em metanol. As soluções foram armazenadas a -20 °C, em frascos âmbar.

3.5 Amostras de Plasma

As amostras de plasmas, utilizadas para o desenvolvimento do método foram obtidas do banco de sangue do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto de doadores de sangue voluntários sadios. Foram aceitas bolsas de plasma livres do fármaco em questão (plasma branco). A aplicação do método foi realizada em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica internados no HC-FMRP/USP. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso. As análises foram realizadas no Laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (FCFRP/USP).

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP, processo 6695/2010 (anexos).

3.6 LLE

Previamente à etapa de extração dos analitos o plasma utilizado foi centrifugado a 2300 x *g* por 15 minutos para sedimentação de qualquer material particulado.

A LLE foi empregada com o objetivo de extrair o analito de interesse da fase aquosa (plasma) para a fase orgânica (solvente extrator). Assim, para avaliar as condições de preparo da amostra, os experimentos foram realizados transferindose 500 µL de plasma branco (sem o analito de interesse) previamente centrifugado, 50 µL da solução de trabalho de OME e metabólitos na concentração de 40,0 µg/mL para um tubo de fundo redondo. Posteriormente foram acrescentados 50 µL de solução de PI (100 µg/mL) e 50 µL de NaOH 200 mM. Em seguida, foi realizada a LLE com adição de 2,5 mL do solvente extrator (solventes testados: acetato de etila, MTBE, ISO, ACE, éter isopropílico e hexano). Após a extração, a fase orgânica foi transferida para um tubo cônico e evaporada e o resíduo dissolvido em 200 µL de fase móvel. Os ensaios também foram realizados com plasma não fortificado (plasma branco, sem solução padrão de OME e PI) para verificar a presença de interferentes na matriz biológica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Além dos solventes extratores também foi avaliado o tipo de agitação, por vórtex ou mesa agitadora, e o tempo de agitação. A figura 1-1 apresenta um fluxograma detalhado do procedimento de extração. **Figura 1.1:** Fluxograma referente ao procedimento de extração do OME e metabólitos em amostras de plasma por LLE.





Fonte: Própria autoria.

3.7 Validação do método analítico

A validação do método analítico é primordial para determinar a capacidade deste método em produzir resultados confiáveis e interpretáveis para que possa ser aplicado na rotina laboratorial. A validação dos métodos desenvolvidos neste trabalho foi baseada na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, ANVISA (Brasil, 2012).

Os parâmetros avaliados para extração do OME e metabólitos foram: seletividade, efeito residual, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade (ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração, longa

duração, pós-processamento e estabilidade do analito e PI em solução) (ANVISA, 2012).

3.7.1 Seletividade

A seletividade analisa a capacidade do método em identificar e diferenciar o analito de interesse e o PI na presença de outros componentes endógenos do material biológico ou interferentes que possam estar presentes na amostra (ANVISA, 2012). A seletividade foi mensurada através da análise de seis fontes distintas de plasma branco, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1.

Além disso, por se tratar de pacientes com diversos distúrbios metabólicos e que fazem uso de vários fármacos que foram administrados concomitantemente ao OME é de primordial importância avaliar estes fármacos como possíveis interferentes. São eles: atenolol, ácido fólico, anlodipina, bupropiona, captopril, carbonato de cálcio, clortalidona, ciclobenzaprina, diclofenaco, dipirona, enalapril, fluoxetina, furosemida, hidroclorotiazida, lansoprazol, losartana, metformina, metildopa, nimesulida, paracetamol, propanolol, sertralina, sinvastatina, T4, topiramato, tramadol e vitaminas C, D3 e E.

Para isto, 50 µL da solução de cada um destes fármacos foram transferidos, separadamente, para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo dissolvido em 200 µL de FM e realizada a análise cromatográfica nas mesmas condições estabelecidas para análise do OME e metabólicos. Após análise, os fármacos que apresentaram tempo de retenção semelhante ou próximo ao OME, seus metabólitos e PI foram adicionados ao plasma e estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1 e realizada a análise cromatográfica. Novamente os tempos de retenção foram comparados com os tempos do OME, metabólitos e PI.

3.7.2 Efeito residual (carryover)

O efeito residual é o aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação oriunda de amostras analisadas previamente (ANVISA, 2012). A avaliação do efeito residual foi realizada pela análise de uma amostra de

plasma branco seguida da injeção de uma amostra de plasma enriquecida na concentração equivalente ao LSQ (limite superior de quantificação) e na sequência a injeção de duas amostras de plasma branco, todas submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1.

3.7.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2012).

Para avaliar a linearidade do método, 500 µL de plasma branco foram fortificados com 50 µL da solução padrão do PI (100 µg/mL) e 50 µL das soluções de trabalho de OME e metabólitos nas concentrações do LIQ, do CQB, do CQM, do CQA e do LSQ de acordo com a tabela 1.1. Em seguida as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1, em triplicata.

Tabela 1.1. Concentrações plasmaticas do OME e metabolitos.					
Solução de trabalho (μg/mL)	Concentração plasmática (ng/mL)	Definições			
0,8	20	LIQ - Limite inferior de quantificação			
1,6	40	CQB - controle de qualidade de concentração baixa			
4,0	100				
8,0	200	CQM - controle de qualidade de			
20,0	500	concentração media			
30,0	750	CQA - controle de qualidade de concentração alta			
40,0	1000	LSQ - limite superior de quantificação			

Tabela 1.1: Concentrações plasmáticas do OME e metabólitos.

Fonte: Própria autoria.

O gráfico de linearidade foi construído plotando-se no eixo das abscissas os valores de concentração plasmática e no eixo das ordenadas a razão entre a área do OME e de cada metabólito pela área do PI. A análise estatística dos dados foi avaliada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). A adequação do método foi realizada pela análise de variância ANOVA *Lack of Fit* (LOF), com o cálculo dos valores de F e *p*, com nível de confiança de 95%. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa MINITAB Release versão 14.1.

3.7.4 Precisão e exatidão

A precisão do método analítico é descrita como a proximidade dos resultados obtidos repetidamente sendo expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Enquanto que a exatidão é definida como a concordância de um valor obtido com um valor de referência e é expresso pelo erro padrão relativo (EPR%) (ANVISA 2012). A precisão e exatidão intraensaios foram mensuradas por repetições feitas em um mesmo dia, após a fortificação de 500 µL de plasma branco com 50 µL do OME e metabólitos nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA e 50 µL do PI, avaliadas em quintuplicata. Enquanto que a precisão e exatidão interensaios foram determinadas em três dias consecutivos, nas mesmas concentrações citadas acima, também em quintuplicata. Após análise cromatográfica os valores de CV% e EPR% foram calculados conforme as equações 1 e 2, sendo aceitos valores de CV% e EPR% < 15%, exceto para o LIQ, sendo admitidos valores≤ 20% (ANVISA, 2012).

3.7.5 Estabilidade

O ensaio da estabilidade é executado para comprovar que as etapas de preparo, análise e armazenamento da amostra não prejudicam a concentração do analito em estudo (ANVISA, 2012). A avaliação da estabilidade foi realizada fortificando-se 500 µL de plasma com 50 µL de OME e metabólitos nas concentrações plasmáticas do CQB (40 ng/mL) e CQA (750 ng/mL) (n=3). Logo após, as amostras foram submetidas às diferentes condições para análise da estabilidade foram realizados baseados em uma curva analítica extraída, na faixa de concentração de 20 – 1000 ng/mL. Após isto foram calculados o CV% e do EPR % e as amostras foram consideradas estáveis quando não foram obtidos valores superiores a 15 %.

A) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de plasma fortificadas nas concentrações plasmáticas do CQB e CQA foram congeladas a -20 °C por 12 horas e posteriormente descongeladas à temperatura ambiente, e novamente congeladas a -20 °C completando-se um ciclo. Depois de três ciclos de congelamento e descongelamento foram adicionados 50 µL do PI nas amostras e em seguida submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1.

B) Estabilidade de curta duração

Este procedimento avalia o tempo que o analito de interesse resiste à temperatura ambiente na qual a amostra será processada e analisada. Assim, as amostras fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente por 5 horas, para só então serem extraídas conforme procedimento descrito na figura 1.1. O período de 5 horas foi adotado, pois foi o tempo total necessário para executar todo o procedimento de extração e iniciar a injeção das amostras.

C) Estabilidade de longa duração

Este ensaio avalia a estabilidade da amostra fortificada submetida ao congelamento e armazenamento por um período maior que o intervalo de tempo entre a primeira coleta das amostras em estudo e a avaliação da última amostra coletada (período de aproximadamente 180 dias). Assim, as amostras fortificadas foram armazenadas a -20 °C por seis meses, e então submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1.

D) Estabilidade pós-processamento (auto-injetor)

As amostras de plasma fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1 e acondicionadas no injetor automático do equipamento de HPLC por um período total de 14 horas, onde permaneceram em *stand-by*. Ao final deste período as amostras foram injetadas. Este período de 14 horas foi adotado, visto que foi o tempo total em que a última amostra era injetada, ou seja, o tempo total de espera entre a primeira e a última injeção.

E) Estabilidade do analito e PI em solução

Avalia a estabilidade do analito de interesse, bem como do PI, nas soluções padrão, em metanol, durante seu armazenamento ao longo de todo estudo. Assim, foram analisadas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,8 a 40 µg/mL que correspondem às concentrações plasmáticas de 20 a 1000 ng/mL no início do desenvolvimento do estudo e após o final do estudo, ou seja, após 6 meses de armazenamento à -20 °C. Após realizadas as análises nas soluções padrões armazenadas e recém-preparadas, foi calculado o CV % e EPR % e as amostras foram consideradas estáveis quando não foram obtidos valores superiores a 10 %.

3.8 Aplicação do método

O presente trabalho foi realizado com a contribuição do Departamento de Cirurgia e Anatomia do HC-FMRP/USP, que cedeu contato direto com os pacientes internados no HC-RP. Assim, após o desenvolvimento e validação do método, este foi aplicado em amostras de plasma de 20 pacientes que fazem uso de OME (40 mg) e que foram submetidos à cirurgia bariátrica do tipo Gastroplastia com Derivação Gastrojejunal em Y-de-Roux (RYGB, do inglês: *Roux-en-Y gastric bypass*). A primeira coleta de amostra de sangue foi realizada um dia antes do procedimento cirúrgico e a segunda coleta foi realizada 30 dias após a cirurgia bariátrica em vários tempos (figura 1.2). Também foram coletadas amostras de 5 voluntárias sadias com IMC normal (entre 18,5 e 25), e que não fazem uso do OME, nos mesmos tempos de coleta. Tais amostras foram utilizadas como grupo controle. O sangue total foi colhido com anticoagulante heparina e as amostras centrifugadas para separação do plasma, que foi armazenado em freezer -20°C até o momento da análise.





Fonte: Própria autoria.

3.9 Análise dos dados e cálculos

A análise dos dados obtidos foi realizada comparando-se os tempos de coleta. O teste t de Student não pareado foi utilizado para avaliar a significância entre os grupos testados e controle amostra A (0 min) em um nível de significância (p<0,05). Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0.

4. Resultados e discussão

4.1 Determinação das condições analíticas

Para composição da FM foram avaliadas diferentes proporções de solvente: ACN:água (70:30, v/v); ACN:água (75:25, v/v); ACN:água (50:50, v/v); ACN:água (30:70, v/v) e ACN:água (20:80, v/v). Após a avaliação de diferentes composições de FM, a condição que resultou em uma análise adequada em relação ao tempo de retenção e eficiência do OME, HOME e OMES foi a FM composta por ACN:água (30:70, v/v), vazão de 1mL/min e detecção em 302 nm (figura 1.3).

Figura 1.3: Cromatograma referente à análise do HOME, OME e OMES em solução padrão (40 μ g/mL). Condições cromatográficas: coluna Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m). FM: ACN: água (30:70, v/v), vazão de 1mL/min e detecção em 302 nm. Os picos com o tempo de 4,5; 8,3; 11,2; 16,8 min correspondem a HOME, PI, OME e OMES respectivamente.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

4.2 Padrão interno (PI)

O PI é uma substância diferente do analito de interesse, que é adicionada à amostra a ser quantificada para assessorar no processo de quantificação e corrigir os erros decorrentes de perdas que podem existir durante o processo de extração do fármaco da matriz biológica (RIBANI et al., 2004). O PI deve apresentar algumas características como: estar completamente separado dos demais compostos presentes na amostra, eluir próximo ao analito de interesse, não estar presente na amostra original, não reagir quimicamente com a amostra e estar aproximadamente na mesma concentração do componente a ser quantificado (ALMANSA-LO et al., 2001).

Dentre os fármacos avaliados, a fenacetina foi a que atendeu a todos os critérios importantes para escolha do PI, portanto, este foi selecionado como PI para a quantificação do OME. Nas condições analíticas selecionadas para análise do OME e de seus metabólitos, a fenacetina apresentou tempo de retenção de 8,3 min (figura 1.3).

4.3 LLE

O preparo de amostra é uma etapa crítica do processo analítico e tem como objetivos adquirir uma subfração da amostra original, livre de interferentes (*clean up*) e concentrar o analito de interesse (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). O ideal é que esta etapa seja um procedimento simples, não apenas com o objetivo de reduzir o tempo do processo analítico, mas também porque quanto maior o número de passos envolvidos, maior a chance de se introduzir erros.

O OME é uma base fraca (pKa₁ = 4,2 e pKa₂ = 9,0) que para ser particionado e extraído com maior facilidade pelo solvente orgânico, precisa estar na forma não ionizada (forma molecular), ou seja, a fase aquosa precisa ter seu pH ajustado para alcalino, assim os analitos de interesse (OME, HOME e OMES) terão maior afinidade pela fase orgânica. Portanto, o pH da amostra foi ajustado com a adição de 50 μ L de uma solução de NaOH 200 mM atingindo-se deste modo o pH final de 10,0.

Para avaliar o solvente mais adequado para a extração, foram testados diferentes tipos de solventes orgânicos nas seguintes condições: 500 μ L plasma, 50 μ L solução de OME, 50 μ L PI, 50 μ L NaOH 200 mM, 2,5 mL de solvente extrator, 35 minutos de agitação em mesa agitadora, centrifugação 2300 x *g* a 20°C por 15 min. A figura 1.4 apresenta os gráficos de recuperação do OME, HOME e OMES, onde é possível observar que o solvente que apresentou maior porcentagem de recuperação para os três analitos foi o MTBE, sendo este o solvente extrator utilizado no método, seguido pelo acetato de etila, entretanto apesar da melhor toxicidade apresentada pelo segundo solvente, este apresenta taxa de evaporação muito elevada (450) o que aumentou o tempo da extração inviabilizando seu uso (Ficha de informações de segurança de produto químico, Quimidrol, 2007).
Figura 1.4: Eficiência do processo de extração do OME, HOME e OMES por LLE em amostras de plasma. O eixo Y representa a porcentagem de recuperação do OME após LLE em relação ao controle (não extraído - controle = 100%), e o eixo X os solventes orgânicos avaliados.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

Além do tipo de solvente, foi avaliada também a agitação das amostras. Deste modo, foi comparada a agitação dos tubos em *vórtex*, por 30 e 60 segundos e em mesa agitadora (*shaker*), por 15, 25 e 35 minutos com o objetivo de favorecer a partição dos analitos para o solvente orgânico. Pode ser observado pelo gráfico da figura 1.5 que a mesa agitadora apresentou maior porcentagem de recuperação do OME e metabólitos.

Figura 1.5: Avaliação da LLE assistida por vórtex (A) e mesa agitadora (B) para extração do OME e metabólitos em amostras de plasma em diferentes tempos. O eixo Y representa a porcentagem de recuperação do OME após LLE e o eixo X os diferentes tempos avaliados.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

O emprego do *vórtex* favoreceu a dispersão do solvente orgânico na fase aquosa. Porém, não apresentou melhora na eficiência da extração do OME e metabólitos (figura 1.5A), onde foi obtida recuperação máxima de 58% com agitação por 60 segundos. O uso da mesa agitadora promoveu ampla dispersão do solvente orgânico na fase aquosa e apresentou melhora significativa na eficiência da extração do OME e metabólitos (figura 1.5B). Resultados semelhantes foram obtidos para o OME e HOME por (FRERICHS; ZARANEK; HAAS, 2005) na qual a agitação por 25 minutos em mesa agitadora apresentou melhores valores de recuperação. Como não houve diferença estatística entre os tempos de 25 e 35 minutos, foi escolhido o tempo de 25 minutos de agitação, onde foi obtido valor de 82% de recuperação.

A tabela 1.2 apresenta as condições de extração selecionadas para análise do OME e metabólitos em plasma e a figura 1.6 mostra o perfil cromatográfico, nestas condições, em uma amostra de plasma branco (sem o OME e metabólitos) e uma amostra de plasma fortificado com o OME, metabólitos e PI, após procedimento de extração.

Tabela 1.2: Condições de extração para análise do OME e seus metabólitos em plasma por LLE.

Parâmetro	Condição
Volume solução-padrão OME e metabólitos	50 μL
Volume padrão interno	50 μL
Volume de plasma	500 μL
pH 10	50 μL de NaOH 200 mM
Solvente para extração	2,5 mL MTBE
Tipo de agitação	Mesa agitadora (<i>shaker</i>)
Tempo de agitação	25 min

Fonte: Própria autoria.

Figura 1.6: Cromatogramas referentes à análise de OME e seus metabólitos em amostras de plasma após procedimento de extração por LLE, onde A representa plasma branco e B o plasma fortificado, 1000ng/mL. Condições cromatográficas: vide figura 1.3. Os picos com os tempos de 4,5; 8,3; 11,2 e 16,8 min correspondem ao HOME, PI, OME e OMES, respectivamente.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

4.4 Validação do método analítico

4.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em relação à capacidade de quantificar o OME e metabólitos na presença de interferentes endógenos que possam estar presentes no plasma. Assim, foram analisadas seis amostras de plasma branco de fontes diferentes, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Não foi observada a presença de picos interferentes próximos ou no mesmo tempo de retenção do OME e seus metabólitos e do PI como demonstrado na figura 1.6A.

Além disso, foram avaliados os fármacos coadministrados aos pacientes. De todos os fármacos analisados, apenas a dipirona e o propranolol apresentaram tempos de retenção próximos ao tempo do HOME (4,5 min) e OMES (16,8 min) respectivamente.

4.4.2 Efeito residual (*carryover*)

O efeito residual foi determinado pela avaliação de uma amostra de plasma branco seguida da injeção de uma amostra de plasma fortificada na concentração do LSQ (1000 ng/mL) e na sequência a injeção de duas amostras de plasma branco, sendo todas submetidas ao processo de extração e, após a análise não foi observado efeito residual.

4.4.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada em sete níveis de concentração plasmática (20, 40, 100, 200, 500, 750 e 1000 ng/mL), em triplicata, fortificando-se 500 μL de plasma juntamente com o PI, na concentração de 100 μg/mL e submetendo as amostras ao procedimento de extração descrito na figura 1.1.

A correlação entre a concentração e a razão entre as áreas do OME, HOME e OMES e PI foi feita por regressão linear, pelo método dos míninos quadrados obtendo-se assim a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). Este coeficiente é um dos parâmetros aplicados na avaliação do ajuste da curva e é definido pela razão da covariância entre a concentração (abscissa) e o sinal analítico (ordenada) (FERREIRA, 2013). Os coeficientes de correlação obtidos para as retas atendem as normas estabelecidas (r \geq 0,99). No entanto, apenas o valor do *r* não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva analítica. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, ausência de amostras atípicas (RIBEIRO et al., 2008), e a dispersão das medidas (valores de y) deve ser independente da concentração do padrão de calibração, seguindo uma distribuição normal, propriedade conhecida como homocedasticidade.

A homocedasticidade da regressão linear pode ser avaliada pelo teste de ajuste do modelo, pela observação do gráfico de resíduos *versus* concentração ou pela aplicação do teste F de significância, calculado pela razão entre as variâncias da menor e da maior concentração da faixa linear de concentração que deve ser menor que o F tabelado, o que indica uma variância constante da curva analítica (CARDOSO et al.,2010). Assim, a análise estatística dos dados foi feita pela análise de variância ANOVA *Lack of Fit*, com cálculo dos valores de F e *p* com nível de confiança de 95%. Os dados obtidos para as curvas de calibração analítica, incluindo valor de F tanto tabelado quanto o calculado, e o valor de *p*, mostram que o modelo linear de regressão está bem ajustado para HOME e OME e, portanto, pode ser aceito (tabela 1.3).

Tabela 1.3: Linearidade do método para análise do OME e de seus meta	lbólitos em
plasma.	

	Faixa Linear (ng/mL)	Equação linear	r	ANOVA fi	Lack of t
				F	Р
OME		Y = 0,0047x + 0,0021	0,9997	1,48	0,259
HOME	20 - 1000	Y = 0,0009x - 0,0071	0,9996	0,68	0,646
OMES		Y = 0,0021x - 0,0008	0,9997	2,53	0,000
r= co					

r= coeficiente de correlação, F _{Tabelado} (0,05) = 2,60 Fonte: Própria autoria.

4.4.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em quintuplicata com a fortificação de 500 µL de plasma branco com 50 µL do OME e metabólitos nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA e 50 µL do PI. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 1.1 e o coeficiente de variação (CV %) e o erro padrão relativo (EPR %) foram calculados. A precisão e exatidão intraensaios foram realizadas em um mesmo dia, enquanto que as interensaios foram

determinadas em três dias consecutivos. Conforme podem ser observados nas tabelas 1.4, 1.5 e 1.6 os valores obtidos estão dentro dos recomendados pela ANVISA, (LIQ < 20% e CQB, CQM e CQA < 15%).

Tabela 1.4: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de OME, por LLE.

		INTRAENSAIOS			INTERENSAIOS			
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	
LIQ	20	19,6	2,7	-1,7	19,9	5,1	-0,4	
CQB	40	36,3	6,6	-9,2	38,7	7,3	-3,2	
CQM	500	504,8	1,4	1,0	507,9	1,3	1,6	
CQA	750	766,9	3,0	2,2	748,5	2,3	-0,2	

Fonte: Própria autoria.

Tabela 1.5: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de HOME, por LLE.

		INTRAENSAIOS			INTERENSAIOS			
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	
LIQ	20	23,7	2,0	18,5	22,8	7,0	14,0	
CQB	40	44,4	1,2	11,0	41,9	7,1	4,7	
CQM	500	516,4	2,7	3,3	498,2	7,2	-0,4	
CQA	750	747,3	5,8	-0,4	752,3	2,4	0,3	

Fonte: Própria autoria.

Tabela 1.6: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de OMES, por LLE.

		INTRAENSAIOS			INTERENSAIOS			
С	oncentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	
LIQ	20	19,5	0,6	-2,5	22,3	11,0	11,7	
CQB	40	37,0	5,5	-7,4	38,4	6,5	-3,9	
CQM	500	502,7	0,9	0,5	497,9	5,0	-0,4	
CQA	750	741,1	1,4	-1,2	753,9	1,8	0,5	

Fonte: Própria autoria.

4.4.5 Estabilidade

A estabilidade foi determinada em dois níveis de concentração plasmática, CQB (40 ng/mL) e CQA (750 ng/mL) (n=3). As condições avaliadas foram estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos), estabilidade de curta duração (as amostras fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente por 5 horas e posteriormente extraídas), estabilidade de longa duração (as amostras fortificadas foram armazenadas a – 20 °C por seis meses) e estabilidade pós-processamento (as amostras extraídas foram mantidas por 14 horas dentro do injetor automático até serem injetadas).

Uma curva analítica no intervalo de concentração plasmática de 20 – 1000 ng/mL auxiliou na quantificação das amostras que foram avaliadas e posteriormente foram calculados o CV % e EPR %. Os valores obtidos demonstram que o OME e metabólitos apresentaram estabilidade após serem submetidos aos testes de estabilidade propostos com precisão e exatidão inferior a 15% como exigido pelos guias de validação (ANVISA, 2012) (Tabela 1.7).

Tabela 1.7: Estabilidade das amostras para determinação de OME, HOME e OMES por LLE.

	<u>.</u>	Congelamento e descongelamento		Curta duração (5 horas)		Longa duração (6 meses)		Pós-processamento (14 horas)	
Analitos	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
OME	40	5,2	-3,7	11,2	-3,4	4,2	2,7	6,3	-2,1
	750	3,6	-0,1	12,0	-5,4	8,5	5,1	6,6	0,1
HOME	40	8,4	-4,2	1,3	-11,7	5,1	2,9	1,1	-11,0
	750	6,7	1,0	2,2	-0,1	9,7	5,9	3,7	1,3
OMES	40	6,3	-2,2	7,6	1,0	4,3	-0,1	5,6	-2,5
	750	9,0	-0,5	3,3	-0,9	4,9	0,6	6,5	-2,7

Fonte: Própria autoria.

A estabilidade do OME e metabólitos em solução padrão foi mensurada nas concentrações de 20 a 1000 ng/mL (n=3) em soluções recém-preparadas e em soluções preparadas e armazenadas por seis meses. A tabela 1.8 mostra, nas concentrações do CQB e CQA, que as soluções permaneceram estáveis com valores de CV % e EPR % obtidos abaixo de 10 %, como recomendado pela Anvisa (2012).

Analitos	Concentração nominal (ng/mL)	Soluções recém preparadas Exatidão EPR (%)	Soluções preparadas a 6 meses Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)
OME	40	-3,0	3,9	5,0
	750	3,9	-2,1	3,9
HOME	40	-4,8	6,0	6,8
_	750	-0,1	0,3	3,1
OMES	40	5,5	9,7	7,6
	750	4,4	-1,9	7,7

Tabela 1.8: Estabilidade das soluções padrão de OME, HOME e OMES.

Fonte: Própria autoria.

4.4.6 Determinação do OME e metabólitos em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica

A fim de mostrar a aplicação do método, este foi utilizado para a quantificação do OME e seus metabólitos em amostras de plasma de 20 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. A figura 1.7 apresenta um cromatograma exemplificando a análise de uma amostra de plasma de paciente pós cirúrgico, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME.

Figura 1.7: Cromatograma correspondente a amostra de plasma de paciente, coletada 90 minutos após a administração oral de 40 mg de OME, sendo HOME (4,651 min), PI (8,313 min), OME (11,472 min) e OMES (17,942 min), respectivamente no período pré operatório. Condições cromatográficas: vide figura 1.3.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

O método foi aplicado com sucesso nas amostras de plasma dos 20 pacientes. O teste t de Student foi aplicado e demonstrou que as concentrações plasmáticas foram significativamente menores a partir do tempo de coleta E (90 min) nas amostras coletadas após à cirurgia, quando comparado as amostras coletadas em mesmo tempo no período anterior à cirurgia. Neste estudo a concentração plasmática do OME foi menor no período pós-operatório em comparação com o pré-operatório e ao grupo controle. Assim, devido à menor absorção do OME, consequentemente a concentração de seus metabólitos também foi inferior no pós-operatório (COLLARES-PELIZARO et al., 2017). Esta redução pode ser consequência da mudança anatômica e fisiológica no trato gastrointestinal após a cirurgia bariátrica que podem afetar a farmacocinética da absorção de medicamentos recebidos pelos pacientes. (GESQUIERE et al., 2016) conduziram um estudo semelhante em pacientes bariátricos para investigar a absorção de posaconazol, um fármaco antifúngico também metabolizado pelo CYP3A4. Os pesquisadores observaram uma queda nas concentrações plasmáticas do fármaco nas coletas realizadas em até 9 meses após a cirurgia, e concluíram que o procedimento cirúrgico está associado à mudança na absorção de alguns medicamentos.

Por outro lado, Tandra et al., (2013) realizaram um estudo para verificar a absorção do OME e outros fármacos também metabolizados pelo CYP3A, em pacientes que passaram pela cirurgia há pelo menos um ano. Eles verificaram que não houve diferença nas concentrações plasmáticas dos fármacos analisados entre os pacientes e o grupo de voluntários sadios. Porém, relatam que a CYP3A presente na parede intestinal que é eliminada parcialmente através da cirurgia bariátrica do tipo RYGB, é responsável por 50% da metabolização de diversos fármacos, dentre eles o OME. Os autores concluíram que a parede intestinal do jejuno desses pacientes sofreu adaptação alguns meses após a cirurgia bariátrica e, como foi observado, estes pacientes conseguiram reverter a absorção do OME para concentrações próximas ou até superiores as obtidas em voluntários sadios. Para Tandra et al., (2013) seria necessário conduzir um estudo com período mais próximo à cirurgia, visto que o estudo foi realizado após um ano do procedimento.

Assim, os dados apresentados pelos pesquisadores sobre a CYP3A corroboram com os resultados obtidos no presente estudo que foi conduzido entre 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

5.0 Conclusões

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica empregando a LLE. Este método foi linear, preciso e exato com LIQ de 20 ng/mL. Quando comparado outros métodos descritos na literatura com LIQ semelhante, o presente método apresentou vantagens como menor consumo de amostra biológica (500 µL) metade do volume descrito bem como, menor volume de solvente extrator, cerca da metade do volume adotado em outros estudos (2,5 mL) (SHIMIZU et al., 2006b; NOUBARANI et al., 2010; AHMED; ATIA, 2015b). Assim, o método desenvolvido apresenta valores otimizados dos volumes de solvente e amostra. Além disso, o método desenvolvido permitiu sua aplicação com êxito em amostras reais de pacientes que fazem uso do OME no período pré e pós cirúrgico, auxiliando no tratamento destes pacientes, visto que sua concentração pode ficar comprometida em função do procedimento cirúrgico.

"A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da

humanidade é o fim. "

Thomas Hobbes

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTES ORGÂNICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO OMEPRAZOL E METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Lista de Figuras

Figura 2.1: Avanço do número de publicações utilizando a DLLME como técnica
de preparo de amostra59
Figura 2.2: Fluxograma da OS-DLLME após procedimento de pré-tratamento das
amostras de plasma66
Figura 2.3: Fluxograma da OS-DLLME após realização do pré-tratamento das
amostras de plasma com solvente orgânico67
Figura 2.4: Fluxograma referente à coleta de sangue nos pacientes, no período pré
e pós operatório que fazem uso do OME71
Figura 2.5: Espectro de massas das moléculas precursoras A) OME: m/z 346 -
m/z 198 e m/z 136; B) HOME: m/z 362 - m/z 214; C) OMES: m/z 362 - m/z 150 e
D) PI: m/z 370 – m/z 25272
Figura 2.6: Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME,
HOME, OMES (4,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL) e, submetida à extração OS-DLLME.
Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,63 min e 11,7 min correspondem respectivamente ao
HOME, OME, OMES e PI. Condições cromatográficas: vide tabela 2-
577
Finne 0.7. Augliga en activita annômica a na marchita e e a statu
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteinas
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05).
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582 Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582 Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por emetabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582
Figura 2.7: Avaliação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582 Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582 Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-583
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582 Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por E metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-583 Figura 2.10: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área dos analitos. A
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínasplasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05).
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (<i>p</i> <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 μL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (<i>p</i> <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteinas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de CHCl ₃
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (<i>p</i> <0,05). Condições da OS-DLLME: 1mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 μL de CHCl ₃ 80 Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (<i>p</i> <0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2-582
Figura 2.7: Availação do solvente organico para precipitação das proteínasplasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p <0,05).

xviii

Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 µg/mL) e PI (10,0 µg/mL); B) Cromatograma de uma amostra de plasma real de paciente, coletada 150 minutos após a administração oral de 40 mg de OME e, submetidas à extração OS-DLLME. Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,76 min e 11,5 min correspondem respectivamente a HOME, OME, OMES e PI. Condições cromatográficas: vide tabela 2-5.______96

Tabela 2.1: Fatores e níveis da matriz de PB68
Tabela 2.2: Fatores e níveis aplicados no CCD. 68
Tabela 2.3: Parâmetros estabelecidos para determinação de OME, HOME, OMES
e PI por LC-MS/MS em ESI+ no modo de aquisição
MRM74
Tabela 2.4: Parâmetros instrumentais avaliados para determinação de OME,
HOME, OMES e PI por LC-MS/MS em ESI ⁺ no modo de aquisição
MRM75
Tabela 2.5: Condições cromatográficas para determinação do OME, HOME, OMES
e PI76
I abela 2.6: Soluções tampao testadas na faixa de pH 7-12. 81
Tabela 2.7: Coeficientes do modelo de superficie de resposta para a OS-
DLLME87
DI I ME
Tabela 2.9: Linearidade do método para determinação do OME e de seus
metabólitos
plasma. 90
Tabela 2.10: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para
determinação de OME, por OS-DLLME90
Tabela 2.11: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para
determinação de HOME, por OS-DLLME91
Tabela 2.12: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para
determinação de OMES, por OS-DLLME91
Tabela 2.13: Efeito matriz (n=5) do método analítico para determinação de OME,
HOME, OMES e PI91
Tabela 2.14: Estabilidade das soluções padrão de OME, HOME e
UMES92
Tabela 2.15: Estabilidade das amostras para determinação de OME, HOME e
OMES por DLLME93 93 Tabela 2 16: Características des pasientes avaliades 94
Tabela 2.10. Calacterísticas dos pacientes availados94
nacientes submetidos à cirurdia bariátrica no período pré e pós operatório pos
tempos de coleta A (0 min) B (15min) C (30 min) D (60 min) e E (90 min) Todos
os pacientes são do sexo feminino incluindo o controle (grupo com IMC
normal).
Tabela 2.18: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de
pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos
tempos de coleta A (0 min), B (15min), C (30 min), D (60 min) e E (90 min). Todos
os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal).
95
Tabela 2.19: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de
pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos
tempos de coleta A (0 min), B (15min), C (30 min), D (60 min) e E (90 min). Todos
os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC

normal)._____95

XX

Lista de Abreviaturas

ACE: acetona

ACN: acetonitrila

C2Cl4: tetracloroetileno

C₆H₅CI: clorobenzeno

CCD: delineamento composto central

CCl4: tetracloreto de carbono

CH2Cl2: diclorometano

CHCI3: clorofórmio

CQA: controle de qualidade de concentração alta

CQB: controle de qualidade de concentração baixa

CQM: controle de qualidade de concentração média

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo

DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, dispersive liquid-

liquid microextraction

DoE: delineamento de experimentos, do inglês, design of experiments

DPR: desvio padrão relativo

EF: fator de enriquecimento, do inglês, enrichment factor

EPR: erro padrão relativo

ESI: do inglês, eletrospray

ETOH: etanol

FM: fase móvel

FMN: fator de matriz normalizado

HCFMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HOME: 5-hidroxiomeprazol

IMC: Índice de massa corpórea

ISO: álcool isopropílico

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês, *liquid chromatography–mass spectrometry*

LIQ: Limite inferior de quantificação

LLE: extração líquido-líquido, do inglês, liquid-liquid extraction

LOF: do inglês, lack of fit

LSQ: limite de quantificação superior

MEOH: metanol

MRM: monitoramento de reações múltiplas, do inglês, *multiple reaction*

monitoring

NaCI: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

OME: omeprazol

OMES: omeprazol sulfona

OS: omeprazol sulfido

OS-DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva com solvente orgânico, do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*

PB: Plackett-Burman

PPT: Precipitação de proteínas

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RSM: modelo da superfície de resposta, do inglês, response surfase

methodology

RESUMO

A DLLME é uma técnica de extração desenvolvida por Rezaee et al., (2006) com aplicação inicial em amostras ambientais como a água. Sua execução com amostras mais complexas como o plasma é relativamente recente e pouco utilizada devido à baixa seletividade e eficiência na eliminação de interferentes presentes na matriz. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar a OS-DLLME com auxílio de um delineamento experimental para a extração do OME e metabólitos e posterior aplicação em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. A determinação do OME e metabólitos foi realizada em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), FM composta por ACN:tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5 (50:50, v/v), vazão 0,4 mL/min. A DLLME foi avaliada utilizando 400 µL de plasma e um procedimento de pré-tratamento com 500 µL de ISO. Após isto, 800 µL de sobrenadante foram coletados e realizada a OS-DLLME. Para a OS-DLLME foram avaliadas a influência do tipo e volume de solvente extrator, pH, força iônica do meio, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de diluição da amostra e volume de amostra sobre eficiência da extração usando um delineamento experimental Plackett Burmann seguido pelo CCD. As condições otimizadas foram: 400 µL de plasma, 2,5 mL de solução tampão, 120 µL de clorofórmio, 500 µL de ISO, 0% de NaCl, 5 minutos de centrifugação, sem agitação das amostras, a qual proporcionou recuperação média de 86 % para OME, OMES e PI e 65% para HOME. Posteriormente, o método foi validado e aplicado com sucesso para análise de amostras de plasma de 5 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, no período pré e pós-cirúrgico.

ABSTRACT

DLLME is an extraction technique developed by Rezaee (2006) with initial application in environmental samples such as water. Its execution with more complex samples like the plasma is relatively recent and little used due to the low selectivity and efficiency in the elimination of interferents present in the matrix. An important step prior to DLLME should be the sample preparation step that assists in the detachment of the analyte from plasma proteins, a factor that decreases recovery. Thus, the objective of the present study was to develop the OS-DLLME LC-MS/MS method with the aid of an experimental design for the extraction of OME and metabolites and subsequent application in plasma samples of patients submitted to bariatric surgery. Analysis of OME and metabolites was performed on a liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer on a Zorbax Eclipse XDB -C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) column with pre-column guard cartridge. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile: 10 mM ammonium formate buffer pH 8,5 (50:50, v/v), flow rate of 0.4 mL/min. The experimental design was developed to reduce the number of experiments and to consider the simultaneous interaction of variables to achieve true optimal points. DLLME was evaluated using a pretreatment procedure with 400µL of plasma and 500µL of isopropyl alcohol. After that, 800 µL of supernatant was collected and performed at DLLME. For DLLME, the influence of extractor and dispersion solvent type and volume, pH, ionic strength of medium, agitation time, centrifugation time, sample dilution volume and sample volume on extraction efficiency were evaluated by means of an experimental design Plackett Burmann continued by a central composite design. Plasma, chloroform and isopropyl alcohol volumes were significant. After the use of response surface methodology, the optimum extraction condition was determined using the desirability tool (D) in which the optimized conditions were: 400 µL of plasma, 2.5 ml of buffer solution, 120 µL of chloroform, 500 µL of isopropanol, 0% NaCl, 5 minutes centrifugation, without stirring the samples, which provided a mean recovery of 86 % for OME, OMES and PI and 65 % for HOME. Subsequently, the method was validated and successfully applied for analysis of plasma samples from 5 patients submitted to bariatric surgery, in the pre and post-surgical period.

2.1 Introdução

A DLLME, técnica de microextração desenvolvida em 2006 por Rezaee et al., tem sido abundantemente aplicada devido à sua simplicidade de operação, rapidez, baixo custo e compatibilidade com diversos procedimentos analíticos (Figura 2.1) (SARAJI; BOROUJENI, 2014; ZULOAGA et al., 2015).

Figura 2.1: Avanço do número de publicações utilizando a DLLME como técnica de preparo de amostra.



Fonte: Própria autoria com dados obtidos do ScienceDirect (*dispersive liquid-liquid microextraction*, 12/10/2018).

Todavia, a aplicação desta técnica de microextração tem sido largamente executada para a extração de analitos em amostras ambientais pouco complexas (SARAJI; BOROUJENI, 2014). Em contrapartida, o emprego da DLLME em matrizes complexas como o plasma, soro, urina e alimentos ainda é escasso.

Assim, a aplicação da DLLME em plasma é uma abordagem ainda pouco utilizada devido à baixa seletividade e eficiência de *clean-up* (CAMPONE et al., 2013). Além disso, a porcentagem de recuperação dos analitos é baixa após o procedimento de extração devido à alta porcentagem de ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas (DE OLIVEIRA et al., 2008). Portanto, para aplicação da DLLME a separação do analito das proteínas plasmáticas é necessária. Assim, abordar novas e diferentes estratégias para suplantar estas desvantagens e obter uma amostra final livre dos interferentes da matriz e com boa recuperação é preponderante.

Dentre as possíveis estratégias, destaca-se a precipitação e/ou desnaturação de proteínas em amostras de plasma utilizando quantidades adequadas de reagentes ou solventes orgânicos (SARAJI; BOROUJENI, 2014). A precipitação de proteínas é um dos métodos mais utilizados para o pré-tratamento de amostras complexas como soro e plasma (FLANAGAN; MORGAN; SPENCER, 2006; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). É uma etapa simples e de fácil execução, dispõe de um grande número de agentes precipitantes acessíveis e resulta em menor geração de resíduo ao final do processo (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002). Porém, a precipitação de proteínas apenas separa os analitos das proteínas plasmáticas, não eliminando de forma efetiva os interferentes da matriz e concentrando os analitos. Assim, uma técnica de extração subsequente é necessária para este fim. Normalmente a precipitação de proteínas ocorre durante o procedimento de extração, como na LLE, ou pode ser empregada previamente a outros métodos de extração com o objetivo de favorecer a eficiência da extração (DE OLIVEIRA et al., 2008; BUENO; SILVA; QUEIROZ, 2011).

Este pré-tratamento pode ser realizado através da redução da solubilidade das proteínas seja, pela modificação da solução com a adição de sais, como o sulfato de amônio em altas concentrações, ou pela modificação de solubilidade por mudanças de carga das proteínas por adição de ácidos e bases, agentes precipitantes aniônicos ou catiônicos, os quais ocasionam o rompimento entre a ligação da proteína com o composto de interesse, liberando este último para a fase líquida da mistura (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; FLANAGAN; MORGAN; SPENCER, 2006; POLSON et al., 2003). Além disso, este pré-tratamento pode ser realizado com a utilização de solventes orgânicos como a ACN, ACE, ETOH, MEOH e éter, que resultam na diminuição da constante dielétrica do meio, o que leva à agregação das proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas de sinal oposto, acarretando a perda de solubilidade (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003). A desnaturação das proteínas pode ser realizada também com o aumento da temperatura da amostra. Assim, os grupos hidrofóbicos sulfidrila (SH-), inicialmente

internos nas moléculas são expostos reagindo entre si e formando complexos insolúveis (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003). Outra alternativa de prétratamento é a diluição da amostra biológica para reduzir o efeito da ultrafiltração auxiliada pela centrifugação (REZAEE et al., 2010). Porém, neste processo, o fármaco permanece ligado às proteínas plasmáticas.

Neste trabalho foram avaliados como pré-tratamento o procedimento de precipitação proteica incubando amostras de plasma em diferentes valores de temperatura, alteração do pH e força iônica do plasma, ultrafiltração e a adição de solventes orgânicos. Após este procedimento foi realizada a OS-DLLME como técnica de preparo de amostra.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método para determinação do OME e seus metabólitos (HOME e OMES) em plasma por LC-MS/MS utilizando a OS-DLLME como técnica de preparo de amostra.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a OS-DLLME como técnica de preparo de amostra alternativa e miniaturizada, para a extração do OME e metabólitos em plasma por LC-MS/MS;
- Avaliar as condições para determinação do OME e metabólitos por LC-MS/MS: vazão do gás de nebulização e gás de dessolvatação, temperatura da fonte de ionização e do gás de dessolvatação, energia de colisão, voltagem do capilar;
- Avaliar os diferentes pré-tratamentos de amostra: precipitação proteica incubando amostras de plasma em diferentes valores de temperatura, alteração do pH e força iônica do plasma, ultrafiltração e a adição de solventes orgânicos;
- Avaliar e otimizar os parâmetros da OS-DLLME: tipo e volume de solvente dispersor, tipo e volume de solvente extrator, tempo de extração, tempo de agitação, tempo de centrifugação, volume de diluição, força iônica e pH da amostra, com o auxílio de um delineamento experimental Plackett-Burmann

seguido pelo delineamento composto central com otimização das variáveis.

- Validar o método desenvolvido por OS-DLLME quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade, efeito matriz e seletividade;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de plasma de pacientes em tratamento com OME e submetidos à cirurgia bariátrica no HCFMRP/USP.

3. Material, Casuística e Métodos

3.1 Equipamentos

A análise do OME foi realizada em um cromatógrafo a líquido modelo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto por uma bomba LC-10T, injetor SIL-10AF, forno CTO-10A, controlador CBM-10A, desgaseificador DGU-20A5R, válvula LPGE Kit e um espectrômetro de massas modelo Micromass Quattro LC composto por analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*). A interface entre o sistema cromatográfico e espectrômetro de massas foi realizado pelo *software* MassLynx (versão 3.4).

Para o preparo das soluções foi empregada água ultrapura obtida do sistema Master Modelo MS 2000 (Gehaka, Brasil). A balança analítica utilizada nos procedimentos de pesagem foi da marca Sartorius, modelo MSU225P (Goettingen, Alemanha). O pHmetro utilizado nas medições do pH das soluções tampão foi da marca Hanna, modelo HI 5221 (Tamboré, Brasil) e a homogeneização das soluções foi feita em um agitador de tubos Ika (*vórtex*), modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha). Para a realização das extrações foi utilizada uma centrifuga Hitachi, modelo HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão), um agitador do tipo *vibrax* Ika, modelo VXR basic (Staufen, Alemanha) e banho-maria Fanem, modelo BM 1102 (Guarulhos, Brasil).

3.2 Reagentes e solventes

Foram utilizados os reagentes (grau analítico): formiato de amônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e hidrôxido de amônio (Synth, Diadema, Brasil), cloreto de sódio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), ácido bórico e tetraborato de sódio J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, NJ) ácido fosfórico Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio tribásico) (Synth, Diadema, Brasil).

Também foram utilizados os solventes orgânicos (grau HPLC) acetonitrila, metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), etanol (JT Baker, Estado do México, México), acetona, diclorometano (Macron Chemicals, Center Valley, EUA), álcool isopropílico (Sigma, St. Louis, EUA), hexano, os solventes orgânicos (grau PA)clorofórmio, clorobenzeno, tetracloroetileno (Tedia, Fairfield, EUA), MTBE (JT Baker, Center Valley, EUA) e tetracloreto de carbono (LabSynth, Diadema, Brasil).

3.3 Avaliação das condições cromatográficas por LC-MS/MS

Primeiramente, foram definidos os íons a serem monitorados pela infusão direta no espectômetro de massas de uma solução de 10 μ g/mL de cada analito (OME, HOME, OMES e PI), em tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5 e ACN (50:50, v/v) na vazão de 10 μ L/min. Os íons fragmentos foram determinados pela análise no modo de varredura (do inglês, *full scan*), compreendendo a faixa de massas *m/z* de 40 a 500.

Após a definição do molécula protonada, os parâmetros do espectômetro de massas como: vazão do gás de nebulização e gás de dessolvatação, temperatura da fonte de ionização e do gás de dessolvatação, energia de colisão, voltagem do capilar foram estabelecidos para a definição dos íons produtos mais abundantes.

Para cada íon precursor foi definido o íon de transição (íon produto) que exibiu maior afluência consonante. Para tal, os íons foram fragmentados na cela de colisão com o auxílio do gás argônio aliado à energia de colisão, aplicada para geração dos íons produtos. A obtenção dos espectros foi realizada no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês, *Multiple reaction monitoring*). A avaliação das condições cromatográficas foi realizada pela variação dos parâmetros composição e vazão da fase móvel. Assim, foram avaliadas FMs compostas por acetato de amônio 10 mM:ACN nas proporções de 50:50 (v/v) e 60:40 (v/v). Também foi avaliado solução tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5:ACN nas proporções 50:50 (v/v), 70:30 (v/v), 60:40 (v/v), 30:70 (v/v) e 40:60 (v/v), na vazão de 0,3 e 0,4 mL/min. A condição que proporcionou uma análise adequada em relação ao tempo de retenção e eficiência foi selecionada para determinação do OME, HOME e OMES.

3.4 Soluções padrão de OME, metabólitos e PI

Os padrões analíticos de OME, HOME e OMES foram adquiridos e preparados conforme descrito no capítulo 1 item 3.2. O lansoprazol (pureza > 98%) utilizado como PI foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

As soluções estoque do OME e metabólitos (HOME, OMES) foram preparadas conforme descrito no capítulo1 item 3.4. O lansoprazol foi preparado na concentração de 1 mg/mL como solução estoque em metanol e a solução de trabalho na concentração de 10 µg/mL também em metanol. As soluções foram armazenadas a -20 °C, em frascos âmbar.

3.5 Amostras de Plasma

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP, processo 6695/2010 (anexos). Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico foram empregadas amostras de plasma obtidas do banco de sangue do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto de doadores de sangue voluntários sadios. Foram aceitas bolsas de plasma livres do fármaco em questão (plasma branco).

A aplicação do método foi realizada em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica internados no HCFMRP/USP. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso. As análises foram realizadas no Laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (FCFRP/USP).

3.6 Procedimento de pré-tratamento de amostra

3.6.1 Avaliação da temperatura

A desnaturação das proteínas por temperatura foi realizada em 500 μ L de plasma previamente centrifugados e fortificados com 50 μ L da solução de OME e metabólitos e 50 μ L da solução de PI. Logo após, o plasma foi incubado em banhomaria nas seguintes temperaturas: 40, 50 e 60 °C seguida da centrifugação da amostra por 15 minutos a 2300 x *g* a 4°C. Posteriormente foi realizada a OS-DLLME no sobrenadante (cerca de 400 μ L foram recuperados). Também foi avaliada a

estabilidade dos analitos diante do aumento da temperatura, ou seja, soluções padrão do OME e metabólitos e PI foram incubadas em banho-maria nas mesmas temperaturas e por igual tempo e os valores de área foram comparados aos valores obtidos em soluções que não foram submetidas à incubação. A OS-DLLME foi executada utilizando o sobrenadante recuperado (400 µL) segundo o procedimento descrito na figura 2.2.

3.6.2 Avaliação da alteração do pH e da força iônica

O procedimento de pré-tratamento por alteração do pH e da força iônica foi realizado através da redução da solubilidade das proteínas pela adição de soluções alcalinas: sulfato de zinco 10% em NaOH 500 mM, NaOH 10 mM e sulfato de zinco 10% em ACN (50:40, v/v); adição de sais para alterar a força iônica do meio: sulfato de amônio saturado e sulfato de sódio saturado; e de soluções ácidas: ácido tricloroacético 10% e ácido clorídrico 6 mM. Assim a extração foi realizada com 500 μ L de plasma previamente centrifugados, fortificados com 50 μ L da solução de OME e metabólitos e 50 μ L da solução de PI e agitados em *vórtex* por 30 segundos. Em seguida, 1 mL das soluções ácidas/básicas/sais foi adicionado e os tubos foram agitados por 2 minutos a 2000 rpm com o auxílio do *vibrax*. Logo após, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2300 x *g* a 4°C, o sobrenadante, livre de proteínas, foi recuperado e transferido para um tubo de fundo cônico. Ao final foram obtidos 900 μ L de sobrenadante e realizada a OS-DLLME de acordo com o

3.6.3 Avaliação da ultrafiltração

Para a ultrafiltração foram utilizados filtros Vivaspin[®] (Sartorius) de10 kDa. Antes de seu primeiro uso, os filtros foram condicionados por lavagem com água purificada e centrifugados (2300 x *g*, 4 °C, 15 minutos). Este procedimento foi necessário para hidratar a membrana de celulose e remover quaisquer interferentes. Para avaliar este pré-tratamento, 500 µL de plasma fortificado com OME e metabólitos e PI e 1,0 mL de água purificada foram colocados em tubos cônicos e agitados em vórtex por 1 minuto. Em seguida as misturas foram transferidas para ultrafiltros Vivaspin[®] (Sartorius) com membrana de 10 kDa e capacidade de 4 mL e centrifugados (3200 x *g*, 4 °C, 30 minutos). Após a centrifugação foram obtidos 100 µL de permeado (amostra filtrada) contendo os analitos de interesse e PI que foram empregados na realização da OS-DLLME segundo o procedimento descrito na figura 2.2.

Figura 2.2: Fluxograma da OS-DLLME após procedimento de pré-tratamento das amostras de plasma.



Fonte: Própria autoria.

3.6.4 Avaliação de solventes orgânicos

Na avaliação da desnaturação utilizando solventes orgânicos foram usados o MEOH, a ACE, a ACN, o ETOH e o ISO. Assim, a extração foi realizada com 500 μ L de plasma previamente centrifugados, fortificados com 50 μ L da solução de OME e metabólitos e 50 μ L da solução de PI e agitados em *vórtex* por 30 segundos. Em seguida, 1 mL de solvente orgânico a -20 °C foi adicionado e os tubos foram agitados por 2 minutos a 1500 rpm com o auxílio do *vibrax*. Logo após, os tubos foram centrifugados (15 minutos a 2300 x *g* a 4°C), o sobrenadante livre de

proteínas foi recuperado e transferido para um tubo de fundo cônico. Ao final foram obtidos 900 µL de sobrenadante e realizada a OS-DLLME segundo o procedimento descrito na figura 2.3.

Figura 2.3: Fluxograma da OS-DLLME após realização do pré-tratamento das amostras de plasma com solvente orgânico.



Fonte: Própria autoria.

Assim, após ter sido realizado o pré-tratamento da amostra foi realizada a OS-DLLME e avaliados e determinados o pH da solução tampão (7, 8, 9, 10, 11 e 12) (Tabela 2.6), tipo de solvente extrator (CH₂Cl₂, C₂Cl₄, CHCl₃, C₆H₅Cl e CCl₄) e tipo de solvente dispersor (ACN, ACE, ISO, ETOH, MEOH).

3.7 Delineamento experimental

O delineamento PB foi utilizado para executar a triagem das variáveis relevantes que influenciam na eficiência da extração. Uma matriz foi gerada com

12 experimentos, incluindo cinco pontos centrais, sendo todos os experimentos realizados em triplicata (n=3). Os valores dos pontos alto, baixo e central (média dos valores alto e baixo) estão descritos na tabela 2.1. A resposta avaliada foi a área do OME e metabólitos, visto que, quanto maior a área obtida maior a recuperação do analito.

Tabela 2.1: Fatores e níveis da matriz de PB. Fatores Níveis Baixo (-1) Central (0) Alto (+1) Volume de plasma (µL) 200 350 500 Volume solvente dispersor (ISO- µL) 200 600 1000 Volume solvente extrator (clorofórmio - µL) 100 50 75 0 2,5 5 NaCl (%) Volume de solução tampão (mL) 1,0 2,0 4,0 Tempo de centrifugação (min) 5 10 15 Tempo de agitação em vortex (s) 0 30 60

Fonte: Própria autoria.

3.7.1 Determinação da condição ótima de extração

Na segunda etapa da otimização da extração foi aplicado o CCD a fim de definir a melhor condição para os fatores avaliados como críticos no primeiro teste. O delineamento compreendeu 3 variáreis, gerando assim, uma matriz com 20 experimentos, destes seis sendo pontos centrais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3).

As variáveis que não apresentaram efeito na etapa anterior foram mantidos (2,5 mL de solução tampão, 5 minutos de centrifugação, 0% de NaCl e 0 segundos de agitação) e as variáreis que apresentaram influência foram avaliadas com variação extrema dos volumes avaliados nos teste anterior (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Fatores e níveis aplicados no CCD.							
	Níveis				Pontos estrela (α = 1,68)		
Entoros				-α	+α		
Falores	Baixo (-1)	Central	Alto (+1)				
Volume de plasma (µL)	280	400	520	200	600		
Volume de clorofórmio (µL)	80	120	150	60	180		
Volume de ISO (µL)	320	500	680	200	800		

Fonte: Própria autoria.

3.7.1 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada nos mesmos moldes descritos no capítulo I seção 3.7 sendo baseada na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, ANVISA (Brasil, 2012).

Os parâmetros avaliados para extração do OME e metabólitos foram: seletividade, efeito residual, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade (ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração, pós-processamento e estabilidade do analito e PI em solução) (ANVISA, 2012) descritos no capítulo I item 3.7. Além dos parâmetros descritos também foi avaliado o fator de matriz normalizado (FMN).

3.7.1.1 Fator de matriz normalizado (FMN)

O FMN é aplicado para verificar se o efeito matriz afeta eficiência de ionização do analito no detector. Este fator interfere na quantificação dos analitos e quando presente altera a precisão e exatidão do método (NARDOTTO et al., 2016). O FMN é calculado pela razão da resposta analítica na matriz fortificada com os analitos normalizada pela resposta do PI e dividida pela razão da resposta analítica da solução dos padrões normalizado pela resposta do PI em solução (ANVISA, 2012) conforme demonstrado na equação 3. Sendo que o CV (%) dos FMNs relativos aceitável deve ser inferior a 15%.

Equação 3 FMN = Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução

Assim, amostras de plasma branco (isento dos analitos e do PI) procedente de oito lotes diferentes sendo, quatro de plasma normal, duas de plasma hemolisado e duas de plasma hiperlipidêmico, foram submetidas à extração por OS-DLLME. Após o preparo da amostra a fase sedimentada foi fortificada com OME, HOME e OMES nas concentrações de CQB (40 ng/mL) e CQA (750 ng/mL) e PI. Amostras de soluções padrão nas concentrações de CQB e CQB e CQA e PI também foram analisadas.

3.8 Aplicação do método

Após o desenvolvimento e validação do método, este foi aplicado em amostras de plasma de 5 pacientes que fazem uso de OME (40 mg) e que foram submetidos à cirurgia bariátrica. A primeira coleta de amostra de sangue foi realizada um dia antes do procedimento cirúrgico e a segunda coleta foi realizada entre 30 e 40 dias após a cirurgia bariátrica. Os tempos de coleta das amostras de sangue foram alterados em relação ao método anterior (até 150 minutos após administração oral de 40 mg de OME), pois conforme os resultados apresentados anteriormente a concentração plasmática continuava em ascensão. Assim, os tempos de coleta foram aumentados com o objetivo de visualizar o platô máximo de concentração plasmática (figura 2.4). O sangue total foi colhido com anticoagulante heparina e as amostras centrifugadas para separação do plasma que foi armazenada em freezer -20 °C até o momento da análise.



Figura 2.4: Fluxograma referente à coleta de sangue nos pacientes, no período pré e pós operatório que fazem uso do OME.

Fonte: Própria autoria.

3.9 Análise dos dados e cálculos

A análise dos dados obtidos foi realizada comparando-se os tempos de coleta. O teste t de Student pareado foi utilizado para detectar as diferenças significativas entre os grupos testados e controle da amostra A (0 min) em um nível de significância (p<0,05). Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0.

4. Resultados e Discussão

4.1 Avaliação das condições cromatográficas por LC-MS/MS

Os espectros de fragmentação do OME, HOME, OMES e PI foram obtidos no modo ESI positivo. Assim, as moléculas precursoras foram protonadas e estão representadas por $[M + H]^+$. Foram obtidos os seguintes fragmentos: OME *m/z* 346 – *m/z* 198 e *m/z* 136; HOME *m/z* 362 – *m/z* 214; OMES m/z 362 – m/z 150 e PI m/z 370 – m/z 252. As moléculas apresentam grupamentos básicos, portanto foram analisadas no modo positivo devido à facilidade de protonação, sendo assim obtidos os íons produtos mais abundantes (figura 2.5).

Figura 2.5: Espectro de massas das moléculas precursoras A) OME: *m/z* 346 – *m/z* 198 e *m/z* 136; B) HOME: *m/z* 362 – *m/z* 214; C) OMES: *m/z* 362 – *m/z* 150 e D) PI: *m/z* 370 – *m/z* 252.







Fonte: Análise de dados por software MassLynx.

Para a determinação destes íons alguns parâmetros foram definidos como energia de colisão e voltagem do capilar (Tabela 2.3).

			1 3				-
Analitos	Molécula precursora (<i>m/z</i>)	Íon produto (<i>m/z</i>)	Energia de Colição (eV)	Tensão do capilar (kV)	Tensão do Cone (V)	Tempo de retenção (min)	
OME	346	198	15		25	9,18	
HOME	362	214	20	3,5	25	6,67	
OMES	362	150	25		30	9,63	
PI	370	252	13		20	11,7	
	D / · · · ·						7

Tabela 2.3: Parâmetros estabelecidos para análise de OME, HOME, OMES e PI por LC-MS/MS em ESI⁺ no modo de aquisição MRM.

Fonte: Própria autoria.

Os parâmetros instrumentais foram estabelecidos com o objetivo de aumentar a sensibilidade do espectômetro de massas, assim foram monitoradas a vazão do gás de dessolvatação e nebulização dentre outros fatores (Tabela 2.4).

Condicões ESI *	Valores Definidos
Temperatura da fonte	100 (°C)
Temperatura de dessolvatação	400 (°C)
Energia do capilar	3,5 (kV)
Vazão gás de nebulização (Cone)	75 (L/hora)
Vazão do gás de Dessolvatação	700 (L/hora)
Multiplier	650
Extractor	2.0 (V)
RF Lens	1.0 (V)

Tabela 2.4: Parâmetros instrumentais avaliados para análise de OME, HOME, OMES e PI por LC-MS/MS em ESI⁺ no modo de aquisição MRM.

Fonte: Própria autoria.

Diferentes composições e vazões de FM foram avaliadas com o objetivo de obter menor tempo de corrida cromatográfica, limpeza adequada do sistema e melhor eficiência dos picos. Para isto, foi injetada uma mistura de OME, HOME, OMES (4,0 µg/mL) e PI (10,0 µg/mL), em solução de ACN:H₂O 1:1 (v/v). Foram avaliadas duas composições de FM com diferentes proporções de solvente. A FM composta por acetato de amônio 10 mM: ACN foi estudada nas proporções 50:50 (v/v) e 60:40 (v/v). Entretanto, a FM pode ter afetado a ionização dos analitos, pois os sinais apresentados foram inconstantes entre as corridas cromatográficas realizadas. Assim, esta composição foi descartada.

Em seguida foi analisada a FM composta por solução tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5:ACN nas proporções 50:50 (v/v), 70:30 (v/v), 60:40, (v/v), 30:70 (v/v) e 40:60 (v/v). Foi observado que a solução tampão de formiato de amônio aumentou o sinal [M+H]⁺ em ESI positivo para todos os analitos estudados.

A porcentagem de solvente orgânico na FM foi alterada em diferentes proporções, sendo que o aumento desta (60 e 70%) ocasionou um menor tempo de retenção dos analitos e perda na eficiência. Quando a proporção do solvente foi diminuída (30 e 40%) foi observado maior tempo de retenção e melhora na eficiência de separação e tratando-se de fase reversa o analito tem maior afinidade pela FM. Assim, para manter o compromisso entre tempo de

retenção e eficiência, a proporção 50:50 (v/v) na vazão de 0,4 mL/min foi selecionada.

Assim, após estas avaliações as condições cromatográficas descritas na tabela 2.5 foram selecionadas, sendo possível a eluição do HOME em 6,67 min, OME em 9,18 min, OMES em 9,63 min e PI em 11,7 min (Figura 2.6).

Tabela 2.5: Condições cromatográficas para determinação do OME, HOME, OMES e PI.

Parâmetros	Condições
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Coluna de guarda	Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm)
Composição da FM	ACN: tampão formiato de amônio 10 mM pH 8,5 (50:50, v/v)
Vazão da FM	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	40 °C
Tempo total de corrida cromatográfica	13 min
Fonte: Própria autoria	

Fonte: Própria autoria.
Figura 2.6: Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (4,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL) e, submetida à extração OS-DLLME. Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,63 min e 11,7 min correspondem respectivamente ao HOME, OME, OMES e PI. Condições cromatográficas: vide tabela 2.6.



Fonte: Análise de dados por software MassLynx.

4.2 Procedimento de pré-tratamento de amostra

4.2.1 Avaliação da temperatura

O pré-tratamento utilizando temperatura como agente precipitante foi realizado em banho-maria em três diferentes valores de temperatura: 40, 50 e 60 °C, por um período de até 120 min. Para a temperatura de 40 °C não foi observada a precipitação das proteínas após 120 min de incubação em banho-maria. Já na temperatura de 50 °C foi observada a precipitação proteica e formação de *pellet* de proteínas no fundo do tubo após 90 min de incubação. Assim, as amostras foram centrifugadas e no sobrenadante, cerca de 400 µL, foi realizada a OS-DLLME. Contudo, após a realização da OS-DLLME a porcentagem de recuperação do OME foi relativamente baixa (cerca de 33%), provavelmente devido a estabilidade

do OME e seus metabólitos nesta temperatura. Assim, com o objetivo de verificar a estabilidade do OME, metabólitos e PI nas temperaturas avaliadas (40, 50 e 60 °C), uma alíquota dos analitos em solução padrão foi incubada em banho-maria entre 60 e 150 minutos sem adição de plasma e os valores de área obtidos foram comparados com os valores de áreas obtidas nas amostras de solução padrão que não foram submetidas à incubação. Foi observada uma diminuição expressiva da área dos analitos nas soluções padrão que foram incubadas em banho-maria por tempo semelhante ao das amostras de plasma fortificadas, na temperatura de 50 °C (dados não apresentados). Na temperatura de 60 °C foi observada a formação de uma emulsão, assim as amostras foram descartadas sem serem submetidas a OS- DLLME devido à baixa quantidade de sobrenadante recuperada. Assim, diante dos resultados obtidos este procedimento não foi selecionado para o prétratamento das amostras de plasma previamente a OS-DLLME.

4.2.2 Avaliação do pH e da força iônica

Em seguida foi avaliada a redução da solubilidade das proteínas pela adição de soluções alcalinas e ácidas e de sais para alterar a força iônica do meio.

Após a precipitação utilizando estes diferentes agentes, o plasma foi centrifugado e com o sobrenadante (900 µL) foi realizada a OS-DLLME. No sobrenadante proveniente das amostras de plasma submetidas à precipitação com soluções alcalinas ou solução de sais não foi possível observar a presença do OME e metabólitos devido ao ruído apresentado pela linha de base. Quando a precipitação foi realizada usando os ácidos tricloroacético 10 % e clorídrico 6 M, foi observada a precipitação das proteínas, porém foi muito difícil de corrigir o valor do pH para a faixa alcalina novamente, tendo para isso que ser usada grande quantidade de solução básica, por isso este pré-tratamento não foi utilizado.

4.2.3 Avaliação da ultrafiltração

Outro procedimento de pré-tratamento das amostras de plasma aplicado foi a ultrafiltração utilizando ultrafiltros Vivaspin[®] (Sartorius) com membrana de 10 kDa. A OS-DLLME foi realizada no permeado (100 µL). Porém, não foram observados picos cromatográficos referentes ao OME, metabólitos e PI, pois não houve desligamento do OME das proteínas plasmáticas.

4.2.4 Avaliação de solventes orgânicos

Também foi avaliada a precipitação de proteínas pela adição dos solventes orgânicos: MEOH, ACE, ACN, ETOH, ISO. O emprego de solventes orgânicos como agentes precipitantes proteicos é vantajoso, pois podem ser utilizados também como solventes dispersores na OS-DLLME, visto que apresentam a mesma característica necessária para os solventes dispersores, ou seja, possuem adequada miscibilidade tanto na fase aquosa quanto no solvente extrator (XIAO et al., 2013; FERNANDEZ et al., 2016). Portanto o solvente selecionado para precipitar as proteínas foi empregado também como solvente dispersor, assim como descrito em outros trabalhos (FARAJZADEH; KHORRAM; PAZHOHAN, 2016; FERNANDEZ et al., 2016).

Assim, em tubos de fundo redondo, 500 μ L de plasma branco foram fortificados com OME, metabólitos e PI e posteriormente foi adicionado 1 mL de cada solvente orgânico a ser avaliado. Os tubos foram agitados por 2 minutos no *vibrax* a 1500 rpm e centrifugados a 2300 x *g*, 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante, cerca de 900 μ L, foi recolhido e transferido para um tubo de fundo cônico e realizada a OS-DLLME. Na figura 2.7 é possível observar que o ISO foi o solvente orgânico que proporcionou os melhores valores de recuperação do OME e metabólitos, assim este foi o solvente utilizado nos ensaios posteriores.

Figura 2.7: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas plasmáticas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (p<0,05). Condições da OS-DLLME: 1 mL solvente dispersor, 3,0 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,5, 100 µL de CHCl₃.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

4.3 OS-DLLME

Os testes iniciais para avaliar os demais parâmetros da OS-DLLME foram realizados nas seguintes condições: 1 mL de ISO como solvente dispersor, que foi o agente precipitante com melhor recuperação do OME e metabólitos na etapa de pré-tratamento, 3 mL de solução tampão tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0, 100 μ L do solvente extrator e centrifugação a 2300 x *g*, 4° C por 15 minutos. Neste momento as amostras não foram submetidas à agitação.

4.3.1 Efeito do pH

O pH da fase aquosa é fundamental para a eficiência da extração dos analitos ácidos e básicos e resulta em melhores valores de recuperação. O pH deve ser ajustado levando-se em consideração as propriedades físico-químicas do analito como seu pKa, ou seja, o pH deve estar em uma faixa em que o analito permaneça em sua forma molecular reduzindo assim sua solubilidade na fase doadora (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; ESCUDERO et al., 2013). O OME é uma base fraca e lábel em meio ácido com dois valores de pKa: 4,2 e 9,0, assim a alcalinização no meio o mantém em sua forma não ionizada, o que facilita sua

extração pelo solvente orgânico (BOSCH et al., 2007). Deste modo, a influência do pH da fase aquosa foi avaliada pela adição de diferentes soluções tampão na faixa de pH de 7 a 12, enquanto que os outros parâmetros foram estabelecidos conforme descrito no item anterior.

Tabela 2.6: Soluções	Tabela 2.6: Soluções tampão testadas na faixa de pH 7-12.				
рН	Solução tampão				
7	Fosfato de Sódio				
8 e 9	Formiato de amônio				
9, 10 e 11	Tetraborato de sódio				
12	Fosfato trissódico				
Tentes Drémie esterie					

Fonte: Própria autoria.

Após a execução da OS-DLLME para avaliação do pH da fase aquosa com soluções na faixa de pH 7 a 12 foi observado que o valor de pH 9 (solução tampão de tetraborato de sódio 0,1 M) apresentou melhores valores de recuperação do OME e metabólitos (65,7%). Entretanto, novo estudo foi conduzido com solução tampão de tetraborato de sódio 0,1 M em pH 9,5 que apresentou recuperação superior (72,0%). O pH 9,5 apresentou melhor recuperação devido à porcentagem de distribuição do OME neste pH ser de elevada (61,6%), enquanto que a porcentagem de distribuição em pH 9,0 ser inferior a 40%, ou seja, a ionização do fármaco no meio influenciou diretamente nos valores de recuperação obtidos (figuras 2.8A). Assim, o pH 9,5 foi utilizado nos ensaios posteriores devido à menor ionização do OME. A figura 2.8B apresenta os resultados obtidos após avaliação do pH da fase aquosa (ZHAO et al., 2016) utilizaram pH 10 para executar a SPE-DLLME e análise por LC/MS/MS de diferentes inibidores da bomba de prótons em água, dentre eles o OME. Os pesquisadores observaram que em pH inferior a 10 os rendimentos da extração diminuíram, devido aos analitos estarem predominantemente na forma ionizada.



Figura 2.8: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME (*p*<0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2.6.

Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

4.3.2 Efeito do solvente extrator

A escolha do solvente extrator é um dos fatores que mais influenciam a recuperação e seletividade do método desenvolvido. Assim, esta escolha é pautada em alguns fatores importantes como densidade, baixa solubilidade em água e capacidade de extrair o composto de interesse (REZAEE et al., 2010; LEONG; FUH; HUANG, 2014; YAN et al., 2014). Seguindo estas características foram avaliados os solventes: diclorometano (CH₂Cl₂), tetracloroetileno (C₂Cl₄), clorofórmio (CHCl₃), clorobenzeno (C₆H₅Cl) e tetracloreto de carbono (CCl₄). Entre os solventes avaliados, todos extraíram o OME, metabólitos e o PI, porém o CHCl₃ proporcionou melhores valores de recuperação frente aos demais solventes testados, sendo assim este foi selecionado como solvente extrator (figura 2.9). As condições da OS-DLLME foram as mesmas descritas anteriormente, no valor de pH de 9,5, alcançado pela adição de 3 mL de solução tampão de tetraborato de sódio 0,1 mM.

Figura 2.9: Influência do tipo de solvente extrator na extração do OME e metabólitos por OS-DLLME, (*p*<0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 2.6.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

4.4 Avaliação dos parâmetros que influenciam na eficiência da OS-DLLME usando delineamento experimental

Inúmeros trabalhos ilustram a aplicação da quimiometria e seus delineamentos, PB e CCD, em diversas áreas como a caracterização química de combustíveis (SILVA, 2012), quantificação de pesticidas em frutas e vegetais (ABDULRA'UF; TAN, 2015), avaliação de azeites (GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016), otimização das condições de extração por DLLME de nitrofenois em amostras de água (HASHEMI; SHAMSIPUR; BARATI, 2015) e determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em soro (M. MONZÓN et al., 2016). Também são apresentados trabalhos mostrando a aplicação do planejamento PB na identificação dos fatores que influenciaram a recuperação de diferentes analitos de interesse na extração por DLLME (M. MONZON et al., 2016; PAGAGIOTOU et al., 2009; KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011).

Assim, utilizando o planejamento PB foram avaliadas a influência do volume de plasma, o volume do solvente dispersor e extrator, o efeito *salting out* (adição de NaCl), volume de solução tampão tetraborato de sódio (0,1 mM) pH 9,5, o tempo de centrifugação e o tempo de agitação em *vórtex* em função da área do OME,

metabólitos e PI (Tabela 2.1). O resultado desta avaliação está apresentado na Figura 2.10, no formato de gráfico de Pareto. O volume de CHCl₃, plasma e de ISO foram as três variáreis que exerceram maior efeito sobre a área dos analitos, assim estes fatores foram avaliados na segunda etapa da otimização da extração onde foi aplicado o planejamento CCD, a fim de definir a melhor condição para estas variáreis (volume de CHCl₃, plasma e ISO). Foi observado que o volume de CHCl₃ e plasma apresentaram efeito positivo, enquanto que a variável volume de ISO apresentou efeito negativo, ou seja, foi necessário ampliar a faixa de volume de amostra e solvente extrator na segunda etapa, CDD. A quantidade de sal (% NaCl) adicionada, o volume de solução tampão, tempo de centrifugação e tempo de agitação não tiveram efeitos significativos sobre as áreas dos analitos de modo que para o teste subsequente, eles não foram considerados e assim foram mantidos constantes, ou seja, foram adotados os menores valores analisados para cada variável, com exceção do volume de solução tampão que foi adotado o volume intermediário avaliado, com o objetivo de aumentar a área superficial para a extração dos analitos por OS-DLLME, sendo assim: 0% de NaCI, 2,5 mL de solução tampão tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,5, 5 minutos de centrifugação a 2300 x g a 4°C e 0 segundos de agitação, com obtenção de 1000 µL de sobrenadante.



Figura 2.10: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área dos analitos. A linha vertical define o nível de confiança de 95%.

Fonte: Análise de dados por software Statistica 13. Própria autoria.

4.4.1 Seleção da condição ótima de extração

As variáveis volume de CHCl₃, volume de plasma e volume de ISO foram significativas no teste PB e por isso foram avaliados no delineamento CCD, no intervalo de 60 – 180 μ L para CHCl₃, 200 – 600 μ L para plasma e 200 – 800 μ L para o ISO.

Os principais efeitos, interações variáveis e efeitos quadráticos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) com a utilização do programa STATISTICA 13.0 (Tabela 2.7). Um valor *p* inferior a 0,001 na tabela ANOVA indica a significância estatística de um efeito em nível de confiança de 99%. O p-valor LOF de OME de 0,181 implica que o LOF não é significativo em relação ao erro puro. No entanto, o LOF p-valor de HOME de 0,0001 e LOF p-valor de OMES de 0,043 implica que o LOF é significativo em relação ao erro puro. A qualidade do ajuste da equação do modelo polinomial foi representada pelo coeficiente de determinação, r², (OME, r² = 0,50 e r² ajustado = 0,40; HOME, r² = 0,45 e r² ajustado = 0,35; OMES, r² = 0,27 e ajustado r² = 0,14). O r² é uma medida da quantidade de variação em torno da média explicada pelo modelo. Os grandes valores ajustados de r² denotam uma boa relação entre os dados experimentais e o modelo ajustado.

O volume de plasma exerceu efeito quadrático significativo para OME de modo positivo, ou seja, aumentando-se o volume observa-se aumento na área obtida. Enquanto o volume de ISO desempenhou efeito linear para todos os analitos, sendo este efeito positivo para OME e HOME e negativo para OMES e sendo quadrático significativo positivo para OMES, assim avaliamos que quanto maior o volume de solvente dispersor melhor será a eficiência de extração do OMES. Em relação ao CHCl₃, este apresentou efeito linear negativo para OME e efeito quadrático significativo de modo positivo para OME e HOME, desta maneira aumentando-se o volume de solvente extrator obtém-se melhor eficiência de extração de extração conforme demonstrando na tabela 2.7.

Quanto à interação entre as variáreis, esta foi observada de modo significativo apenas para o HOME, entre plasma e CHCl₃ e entre CHCl₃ e ISO sendo ambos de modo negativo. Pode ser observado na figura 2.10 os gráficos de superfície de resposta representando a influência das variáveis analisadas no CCD sobre as áreas do OME, HOME, OMES e PI, demonstrando visualmente as influências de cada interação entre as variáreis analisadas sobre as áreas obtidas, a região vermelha do gráfico é a região onde se obtém melhores valores de área conforme os volumes adotados. A figura 2.12 apresenta as condições ótimas obtidas ao final do delineamento para obter a máxima extração dos analitos.

Fonte de variação	Soma dos	Grau de	Quadrado	F	р
	Quadrados	liberdade	médio		
OME					
Plasma (L)	-0,04	1	0,02	0,29	0,5870
Plasma (Q)	0,30	1	0,32	13,69	0,0005
ISO (L)	0,18	1	0,33	4,95	0,0310
ISO (Q)	0,06	1	0,04	0,59	0,4444
CHCl₃ (L)	-0,25	1	0,65	9,69	0,0032
CHCl₃ (Q)	0,32	1	1,19	17,84	0,0001
Lack-of-Fit	0,53	5	0,106	1,58	0,1846
Erro Puro	3,02	45	0,067	-	-
R ²	0,49	0,39	-	-	-
HOME					
Plasma (L)	-0,006	1	0,08	8,18	0,0064
Plasma (Q)	-0,001	1	0,08	8,18	0,0063
ISO (L)	0,097	1	0,08	7,79	0,0076
ISO (Q)	-0,032	1	0,01	1,41	0,2406
CHCl ₃ (L)	0,038	1	0,07	7,20	0,0101
CHCl₃ (Q)	0,060	1	0,13	13,16	0,0007
Lack-of-Fit	0,32	5	0,064	6,58	0,00001
Erro Puro	0,44	45	0,009	-	-
R ²	0,45	0,35	-	-	-
OMES					
Plasma (L)	0,03	1	0,008	1,73	0,6793
Plasma (Q)	0,12	1	0,16	3,35	0,0737
ISO (L)	-0,18	1	0,34	7,15	0,0103
ISO (Q)	0,17	1	0,32	6,69	0,0129
CHCl₃ (L)	0,06	1	0,04	0,84	0,3636
CHCl₃ (Q)	0,10	1	0,11	2,35	0,1323
Lack-of-Fit	0,60	5	0,1200	2,52	0,0430
Erro Puro	2,15	45	0,0476	-	-
R ²	0,27	0,14	-	-	-

Tabela 2.7: Coeficientes do modelo de superfície de resposta para a OS-DLLME.

L: efeito linear; Q: efeito quadrático. Fonte: Análise de dados por software Statistica 13. Própria autoria.



Figura 2.11: Gráfico de superfície de resposta representando a influência das variáveis analisadas no CCD sobre as áreas de OME, HOME e OMES.

Fonte: Análise de dados por software Statistica 13. Própria autoria.

Objetivando-se obter a melhor extração do analito o teste de desejabilidade foi aplicado com a finalidade de potencializar a área do OME e metabólitos obtida ao final da extração. Esta condição apontou desejabilidade (D=1,0) nas condições apresentadas na tabela 2.8. Assim, estas condições recomendadas foram

avaliadas e foi obtida recuperação média de 86 % para OME, OMES e PI e 65% para HOME.



Figura 2.12: Gráfico de desejabilidade com as condições otimizadas para extração do OME e metabólitos por OS-DLLME.

Fonte: Análise de dados por software Statistica 13. Própria autoria.

Tabela 2.8: Condições	otimizadas	para	extração	do	OME	е	metabólitos	por	OS-
DLLME.			-						

Variáreis	Condições ótimas
Volume de plasma (µL)	400
Volume de ISO (µL)	500
Volume de CHCl ₃ (µL)	120
Volume de solução tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5 (mL)	2,5
NaCl (%)	0
Tempo de centrifugação (min)	5
Tempo de agitação (s)	0

Fonte: Própria autoria após análise de dados por software Statistica 13. Própria autoria.

4.5 Validação do método analítico

4.5.1 Linearidade

A linearidade do método analítico foi comprovada em amostras de plasma fortificadas com uma mistura de OME, HOME, OMES e PI nas concentrações plasmáticas de 20 – 1000 ng/mL e 500 ng/mL, respectivamente, em quintuplicata.

A correlação entre a concentração e a razão entre as áreas foi feita por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados obtendo-se assim a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) (Tabela 2.9). A validade da regressão atestada pelo teste de falta de ajuste linear (LOF), com intervalo de confiança de 95%. O F_{crítico} (8,887) foi calculado e demonstrou a linearidade do método.

Tabela 2.9: Linearidade do método para análise do OME e de seus metabólitos em plasma.

	,				
			_	F	Р
OME		Y = 0,003x + 0,0173	0,992	0,73	0,165
HOME	20 - 1000	Y = 0,0009x - 0,0048	0,998	1,15	0,350
OMES		Y = 0,002x - 0,0015	0,999	2,73	0,024

r= coeficiente de correlação, F _{Tabelado} (0,05) = 8,887 Fonte: Autoria própria

4.5.2 Precisão e Exatidão

Foram calculados os valores de CV (%) e EPR (%) para precisão e exatidão intraensaios (1 dia) e interensaios (3 dias). Assim, amostras de plasma foram fortificadas em quatro níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM e CQA) com OME, HOME, OMES e PI (500 ng/mL), em quintuplicatas, e processadas segundo procedimento descrito na figura 2.3 (Tabelas 2.10, 2.11 e 2.12).

Tabela 2.10: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de OME, por OS-DLLME.

		INTRAENSAIOS			INTE	RENSAIOS	
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
LIQ	20	20,2	0,2	1,3	23,9	4,7	3,6
CQB	40	40,3	7,3	0,7	36,5	2,4	-11,5
CQM	500	448,7	8,1	-10,3	474,6	3,5	-5,1
CQA	750	696,5	0,4	-7,1	665,2	2,7	-11,3

Fonte: Autoria própria

		INTR	AENSAIOS		INTERENSAIOS		
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
LIQ	20	24,7	13,9	6,9	20,7	1,0	1,0
CQB	40	40,9	8,5	2,4	40,7	7,3	5,6
CQM	500	480,2	14,3	-3,9	472,0	8,1	-7,1
CQA	750	734,1	9,2	-2,1	696,6	0,4	5,1

Tabela 2.11: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de HOME por OS-DLLME

Fonte: Autoria própria

Tabela 2.12: Precisão e exatidão intraensaios e interensaios do método para análise de OMES, por OS-DLLME.

		INTR	AENSAIOS		INTE	RENSAIOS	
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Concentração obtida (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
LIQ	20	20,9	7,4	3,3	22,6	3,4	9,5
CQB	40	41,9	3,9	4,8	36,1	3,9	-9,7
CQM	500	465,6	2,5	-6,9	473,3	3,0	-5,3
CQA	750	764,1	5,2	1,9	715,8	1,7	-4,6

Fonte: Autoria própria

4.5.3 Efeito Matriz

Amostras de plasma branco procedente de oito lotes diferentes sendo, quatro de plasma normal, duas de plasma hemolisado e duas de plasma hiperlipidêmico, foram submetidas à extração por OS-DLLME. A tabela 2.13 apresenta os resultados que demonstram que o método não apresentou efeito matriz.

HOME, OMES e PI.	(······	
Analitos	Concentração nominal (ng/mL)	FMN	Precisão (CV,%)

Analitos	Concentr	ação		FMN		Precisão) (C'	V,%)
HOME, OMES e PI.								
Tabela 2.13: Efeito	matriz (n=5)	para o	método	analítico	para	análise	de	OME,

	2		
	nominal (ng/mL)		
	40	0,85	3,8
OME	750	0,76	2,9
	40	0,99	5,7
HOME	750	0,34	8,9
	40	0,12	0,8
OMES	750	0,54	1,2
	40	0,76	3,7
PI	750	0,87	7,6

Fonte: Autoria própria

4.5.4 Efeito carry-over

A avaliação do efeito residual foi realizada pela análise de uma amostra de plasma branco seguida da injeção de uma amostra de plasma enriquecida na concentração equivalente ao LSQ e na sequência a injeção de duas amostras de plasma branco, todas submetidas ao procedimento de extração por OS-DLLME. O método não apresentou efeito residual no sinal dos analitos exceto para OS que foi excluído dos testes e o PI foi substituído por de fenacetina por lansoprazol devido à faixa de pureza.

4.5.5 Estabilidade das amostras

A estabilidade foi determinada em dois níveis de concentração plasmática, CQB e CBA (n=3). As condições avaliadas foram estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos), estabilidade de curta duração (as amostras fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente por 3,5 horas e posteriormente extraídas), estabilidade de longa duração (as amostras fortificadas foram armazenadas a – 20 °C por 6 meses) e estabilidade pós-processamento (as amostras extraídas foram mantidas por 14 horas dentro do injetor automático até serem injetadas) e estabilidade em solução (Tabela 2.14).

Uma curva analítica no intervalo de concentração plasmática 20 – 1000 ng/mL foi construída para a quantificação dos analitos que foram avaliadas e posteriormente foram calculados o CV% e EPR%. Os valores obtidos demonstram que o OME e metabólitos apresentaram estabilidade após serem submetidos aos testes de estabilidade propostos com precisão e exatidão inferior a 15% como exigido pelo guia de validação (ANVISA, 2012) (Tabela 2.15).

		Soluções recém preparadas	Soluções preparadas a 6 meses	
Analitos	Concentração nominal (ng/mL)	Exatidão EPR (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)
OME	40	0,9	-0,6	7,0
	750	0,5	-0,3	0,7

Tabela 2.14: Estabilidade das soluções padrão de OME, HOME e OMES.

HOME	40	-7,9	2,5	-6,9
	750	-0,9	4,5	8,6
OMES	40	-12,4	-9,7	1,0
	750	-7,7	-11,3	3,4

Tabela 2.15: Estabilidade das amostras para determinação de OME, HOME e OMES por DLLME.

		Congela descong	imento e elamento	Curta du ho	uração (5 ras)	Longa de mes	uração (6 ses)	Pós-processamento (14 horas)		
Analitos	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)	
OME	40	2,4	10,0	7,3	8,8	14,3	-4,3	6,6	-15,0	
	750	-6,1	2,7	0,3	-12,8	9,0	12,2	8,6	-10,3	
HOME	40	1,6	-7,7	8,5	-13,3	0,7	-10,8	0,6	-10,9	
	750	6,2	-11,1	2,9	-7,1	8,3	12,7	7,4	5,21	
OMES	40	5,2	2,0	3,9	-5,0	5,8	-8,6	8,3	-12,4	
	750	4,0	7,0	13,8	8,5	6,0	4,0	7,2	-4,2	

Fonte: Autoria própria

4.6 Aplicação do método

Após o desenvolvimento e validação do método, este foi aplicado em amostras de plasma de 5 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica que receberam uma dose de OME de 40 mg. As amostras de sangue foram coletadas segundo o protocolo descrito na figura 2.4. As tabelas 2.17, 2.18 e 2.19 apresentam os resultados referentes à análise quantitativa do OME, HOME e OMES nos pacientes. Houve uma mudança nos tempos de coleta das amostras. Anteriormente as amostras foram coletadas nos tempos: 0, 15, 30, 60 e 90 min, porém com a aplicação da primeira extração avaliada, LLE, foi observado que nos tempos de 15 e 30 min a concentração plasmática obtida era baixa e a faixa de tempo de coleta não correspondia ao pico de concentração plasmática máxima. Assim, apesar de reduzir o número de pacientes para aplicação da OS-DLLME, o tempo de coleta foi aumentado para: 0, 30, 60, 90, 120 e 150 min sendo possível, assim, uma avaliação de concentração plasmática máxima. Infelizmente não foi possível estender ainda mais este tempo de coleta (180 e 240 min) devido à recusa das pacientes em permanecer por mais tempo à disposição para as demais coletas.

Pode ser observado, pelos resultados obtidos, uma variação muito grande em relação à concentração plasmática dos fármacos em estudo nos pacientes. Uma possível explicação para isto são as características individuais dos pacientes serem extremamente distintas como: peso, idade, síndromes metabólicas apresentadas e medicamentos utilizados diariamente (porém, não foram ingeridos antes da coleta) (tabela 2.16). Além dessas diferenças individuais também deve ser considerada a variabilidade metabólica de resposta à terapia com o OME, e que gera efeitos imprevisíveis (MITROV-WINKELMOLEN et al., 2016). No método desenvolvido por LLE apesar do número de pacientes ter sido relativamente grande (n=20) esta variação também foi observada. Mitrov-Winkelmolen et al., (2016) também observaram variabilidade interindividual no estudo realizado com 40 voluntários.

Nome	Idade (anos)	Peso (kg)	Medicamentos co-administrados
PML	31	121,6	Anticoagulante - Glelaxane
VCO	35	98,5	Losartana e Atenolol
JFTAS	27	126	Valsartana
MMC	33	195	Enalapril, Clonazepam, Neovilar, Tramal
MAS	46	102	Magnésio quelado, Metformina, Propanolol,
			Losartana, Fluoxetina

Tabela 2.16: Características dos pacientes avaliados.

Fonte: Autoria própria

Foi aplicado o teste estatístico t de Student. A concentração foi significativamente menor a partir o tempo de coleta E (120 min) após a cirurgia, do que nos demais tempos de coleta com significância de $p \le 0,05$ para OME, HOME e OMES.

Tabela 2.17: Concentrações plasmáticas do OME em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A (0 min), B (30 min), C (60 min), D (90 min), E (120 min) e F (150 min). Todos os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal).

Paciente		Concer	tração	plasma	ática pr	é-		Concentração plasmática pós-						
		o	peratór	io (ng/r	nL)			operatório (ng/mL)						
	Tempo (min)									Temp	o (min))		
	0	30	60	90	120	150		0	30	60	90	120	150	
1	0	30,4	159,6	160,9	232,2	811,6		0	30,4	226,3	249,1	263,3	343,3	
2	0	29,2	34,8	122,2	174,5	187,9		0	28,9	80,4	138,9	151,8	163,6	
3	0	28,9	31,0	39,0	216,3	276,4		0	28,4	28,4	28,6	28,9	40,4	
4	0	28,8	31,5	44,4	353,6	426,8		0	46,0	46,7	47,9	47,5	48,1	
5	0	32,5	437,9	481,2	514,8	609,8		0	34,0	46,4	63,3	221,9	369,3	

(-) abaixo do LIQ. Fonte: Autoria própria

Tabela 2.18: Concentrações plasmáticas do HOME em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A (0 min), B (30 min), C (60 min), D (90 min), E (120 min) e F (150 min). Todos os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal).

Paciente		Concer	tração	plasma	ática pr	·é-		Concentração plasmática pós-						
		o	peratór	io (ng/r	nL)			operatório (ng/mL)						
	Tempo (min)								Tempo (min)					
	0	30	60	90	120	150		0	30	60	90	120	150	
1	0	48,6	136,2	181,6	232,9	369,4		0	46,9	96,3	101,1	117,9	175,2	
2	0	47,4	130,8	193,5	195,0	245,6		0	47,4	58,3	228,6	255,3	256,2	
3	0	46,9	47,2	51,0	98,8	118,2		0	46,9	46,5	46,3	46,3	48,6	
4	0	49,7	52,7	52,8	52,6	122,5		0	-	-	46,7	107	108,6	
5	0	47,5	48,6	50,2	99,9	145,9		0	-	66,5	100,0	103,1	103,5	

(-) abaixo do LIQ. Fonte: Autoria própria

Tabela 2.19: Concentrações plasmáticas do OMES em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no período pré e pós operatório nos tempos de coleta A (0 min), B (30 min), C (60 min), D (90 min), E (120 min) e F (150 min). Todos os pacientes são do sexo feminino, incluindo o controle (grupo com IMC normal).

Paciente		Concen	tração	plasma	ática pr	·é-		Concentração plasmática pós-					
		op	peratór	io (ng/r	nL)			operatório (ng/mL)					
			Temp	o (min)			Tempo (min)						
	0	30	60	90	120	150	0	30	60	90	120	150	
1	0	-	41,7	62,9	111,5	257,3	0	-	44,3	52,2	58,6	99,7	
2	0	-	-	48,3	53,9	48,9	0	-	43,1	50,5	69,7	47,6	
3	0	-	-	27,9	41,8	62,1	0	-	-	-	-	-	
4	0	42,2	49,3	48,6	85,8	96,1	0	53,4	57,9	59,4	59,4	60,2	
5	0	45,8	70,1	121,7	125,9	133,9	0	26,9	30,3	24,4	46,3	67,7	

(-) abaixo do LIQ. Fonte: Autoria própria

Após a aplicação do método OS-DLLME foi observada que as concentrações plasmáticas do OME, HOME e OMES mantiveram-se superiores no período pré-operatório em comparação ao período pós-operatório a partir do tempo de coleta E (120 min) com significância de $p \le 0,05$ pelo teste t de Student. Assim, os resultados quantitativos obtidos usando a OS-DLLME corroboram com os resultados obtidos e descritos no método desenvolvido usando a técnica de

extração *gold standard* (LLE) e HPLC-UV (capítulo I), onde os resultados apresentam significância no período pós-operatório a partir do tempo de coleta E (90 min), com mesmo nível de significância. A figura 2.13 apresenta um cromatograma de uma amostra real de paciente no tempo F (150 min).

Figura 2.13: A) Cromatograma de uma amostra de plasma fortificada com OME, HOME, OMES (20,0 µg/mL) e PI (10,0 µg/mL). B) Cromatograma de uma amostra de plasma de paciente, coletada 150 minutos após a administração oral de 40 mg de OME e, submetidas à extração OS-DLLME. Onde: 6,67 min, 9,18 min, 9,76 min e 11,5 min correspondem respectivamente a HOME, OME, OMES e PI. Condições cromatográficas: vide tabela 2.6.



Além de o método desenvolvido apresentar resultados semelhantes aos obtidos por LLE também demonstrou LIQ semelhante a outros trabalhos da literatura. (WOOLF; MATUSZEWSKI, 1998) obtiveram LIQ superior ao apresentado neste estudo (25 ng/mL) com extração por SPE utilizando 1 mL de plasma humano e análise por LC/MS/MS sequencial, técnica com boa resolução e melhor seletividade (LANÇAS, 2009). (MITROV-WINKELMOLEN et al., 2016) em estudo com pacientes submetidos a cirurgia bariátrica, também desenvolveram um método com LIQ similar (26 ng/mL) e análise por LC/MS/MS. Além disso, (KANAZAWA et al., 2002) realizaram um estudo cinético do OME após administração via oral de 20 mg e extração a partir de 2 mL de amostra de plasma humano com LIQ de 500 ng/mL. Portanto, este trabalho exibiu desempenhosemelhante ou melhor que outros trabalhos descritos na literatura utilizando-se menor quantidade de amostra biológica.

5.0 Conclusões

No presente estudo foi desenvolvido e validado um método miniaturizado para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica empregando a OS-DLLME por LC-MS/MS. A OS-DLLME, método inovador e inédito para quantificação de OME e metabólitos em plasma, foi linear, preciso e exato com limite de quantificação de 20 ng/mL, LIZ baixo por se tratar de um método miniaturizado. O método de extração foi desenvolvido com o auxílio de um delineamento experimental que possibilitou a otimização da extração por possibilitar a análise individual e em combinação dos fatores envolvidos na extração.

O método desenvolvido permitiu sua aplicação com êxito em amostras complexas de pacientes que fazem uso do OME no período pré e pós- cirúrgico.

"A chave de todas as ciências é inegavelmente o ponto de interrogação." Honoré de Balzac

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM LÍQUIDOS IÔNICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO OMEPRAZOL E METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Lista de Figuras

Figura 3.1: Tabela de ânions e cátions mais empregados como combinação na
síntese de ILs103
Figura 3.2: Fluxograma referente ao procedimento de extração do OME e
metabólitos em amostras de plasma por IL-DLLME109
Figura 3.3: Cromatograma referente à determinação do OME e metabólitos em
solução padrão (10 µg/mL). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2. Os picos
com o tempo de 16,7; 18,60; 20,4; 23,4 min correspondem a OME, OMES, PI e OS
respectivamente111
Figura 3.4: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas
plasmáticas e solventes dispersores para extração do OME e metabólitos por IL-
DLLME, (p<0,05). Condições da IL-DLLME: 500 µL solvente dispersor, 2,5 mL de
tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de cada IL112
Figura 3.5: Influência do tipo de IL comercial na extração do OME e metabólitos
por IL-DLLME, (<i>p</i> < 0,001). Condições cromatográficas: vide tabela 3.1113
Figura 3.6: Cromatograma referente à análise do IL OMImPF ₆ puro (A) e extração
do OME e metabólitos em plasma (B) em solução padrão (10µg/mL). Condições
cromatográficas: vide tabela 3.2. Em B os picos com o tempo de 18,7; 20,0; 20,8;
21,1 min correspondem a OME, OMES, PI e OS respectivamente113
Figura 3.7: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de BMImPF ₆ 115
Figura 3.8: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de BMImPF ₆ 115
Figura 3.9: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, $CDCl_3$) de BMImPF ₆ 116
Figura 3.10: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de HMImPF ₆ 116
Figura 3.11: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de HMImPF ₆ 117
Figura 3.12: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de HMImPF ₆ 117
Figura 3.13: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de OMImPF ₆ 118
Figura 3.14: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OMImPF ₆ 118
Figura 3.15: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de OMImPF ₆ 119
Figura 3.16: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas
plasmáticas e solventes dispersores para extração do OME e metabólitos por IL-
DLLME. Condições da IL-DLLME: 500 µL solvente dispersor, 2,5 mL de tampão
tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de cada IL120

Figura 3.17: Influência do tipo de IL sintetizado na extração do OME e metabólitos
por IL-DLLME, Solvente dispersor: ISO. C12PF6 foi significativo em relação ao C8CI,
C ₁₀ Cl e C ₁₂ Cl, (<i>p</i> < 0,001). Condições cromatográficas: vide tabela 3-1121
Figura 3.18: Influência do IL sintetizado na extração do OME e metabólitos por IL-
DLLME (p< 0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 3-1122
Figura 3.19: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em
plasma. Solvente extrator: IL C12PF6 Condições cromatográficas: vide tabela 3-1.Os
picos com o tempo de 19,7; 23,9; 24,8 e 28,9 min correspondem a OME, OMES, PI
e OS respectivamente122
Figura 3.20: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em
plasma. Solvente extrator: IL C ₈ PF ₆ , pH 9. Condições cromatográficas: vide tabela
3-1124
Figura 3.21: Espectro de RMN de 13 C (400 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆ 125
Figura 3.22: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆ 126
Figura 3.23: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆ 126
Figura 3.24: Espectro de RMN de ¹³ C(1400 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆ 127
Figura 3.25: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCI ₃) de C ₈ PF ₆ 127
Figura 3.26: Espectro de RMN de ¹⁹ F (500 MHz, CDCl ₃) de C ₈ PF ₆ 128
Figura 3.27: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos
por II -DI I ME em plasma. Condições cromatográficas: vide tabela 3-1. 130

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Condições cromatográficas para determinação do OME, OMES, PI e												
OS						-			1	10		
Tabela 3.2: Soluções tampão avaliadas na faixa de pH 7-11. 123												
Tabela	3.3:	Soluções	tampão	testadas	para	extração	do	OME	por	IL-		
DLLME.										129		

Lista de Abreviaturas

ACE: acetona

ACN: acetonitrila

C2Cl4: tetracloroetileno

C₆H₅CI: clorobenzeno

CCl4: tetracloreto de carbono

CH2Cl2: diclorometano

CHCI3: clorofórmio

CV: coeficiente de variação

DPR: desvio padrão relativo

FM: fase móvel

IL: líquido iônico, do inglês, ionic liquid

IL-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico, do

inglês, Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction

ISO: álcool isopropílico

LIQ: Limite inferior de quantificação

MEOH: metanol

OME: omeprazol

OMES: omeprazol sulfona

OS: omeprazol sulfido

RESUMO

Concebidos dentro do conceito de Química Verde (QV) como solventes alternativos aos solventes orgânicos voláteis (VOCs), tóxicos, com grande periculosidade e prejudiciais à saúde, os líquidos iônicos (ILs) são compostos constituídos por íons, pertencendo assim a classe de sais orgânicos com a combinação de diferentes cátions e ânions o que lhes conferem propriedades únicas como baixa pressão de vapor, estabilidade térmica e química, não inflamáveis e não voláteis. Sua utilização como solventes extratores é relevante devido à capacidade de alterar suas propriedades. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os ILs como solventes extratores alternativos na extração por DLLME do OME e seus metabólitos em plasma humano. Foram avaliados três ILs obtidos comercialmente (BMImPF₆, HMImPF₆, OMImPF₆) e oito ILs sintetizados no laboratório NPPNS (C₈PF₆, C₈BF₄, C₈Cl, C₁₀PF₆, C₁₀BF₄, C₁₀Cl, C₁₂PF₆, C₁₂Cl). A análise do OME e metabólitos foi realizada em um cromatógrafo a líquido em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e coluna de guarda Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e FM composta por ACN: água no modo eluição por gradiente (0-10 min, 5:95; 10,0-15 min, 10:90; 15,01-40 min, 30:70, v/v), vazão de 1 mL/min e detecção em 302 nm. A IL-DLLME foi avaliada utilizando 400 µL de plasma e procedimento de pré-tratamento com 500µL de ISO. Após isto, 800 µL de sobrenadante foram coletados e realizada a IL-DLLME como os diferentes ILs comerciais e sintetizados. Dentre os IL comerciais avaliados o que apresentou melhor extração foi o OMImPF₆ com ACN como solvente dispersor. Enguanto que dentre os IL sintetizados o C₈PF₆ apresentou melhor extração juntamente com ISO como solvente dispersor e tetraborato de sódio pH 9,5 como solução tampão. Entretanto, não foi possível o desenvolvimento do método proposto, visto que não houve quantidade suficiente de IL comercial o que impediu a realização dos demais testes essenciais. Em relação aos ILs sintetizados houve dificuldades quanto a sua síntese como presenca de impurezas, influência de reagentes externos e interno da síntese que afetaram a obtenção de ILs puros, fato verificado por análise por RMN. Todavia, apesar do objetivo deste capítulo não ter sido alcancado, foi possível obter valor de recuperação relativamente alto, o qual proporcionaria limites de quantificação adequados para os fins propostos. Entretanto, a grande dificuldade foi obter valores de precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis e adequados para análises quantitativas.

Palavras-chaves: líquidos iônicos, DLLME, síntese.

ABSTRACT

Conceived within the concept of Green Chemistry (QV) as alternative solvents to volatile organic solvents (VOCs), toxic, with great danger and detrimental to health, ionic liquids (ILs) are composed of ions, thus belonging to the class of organic salts with the combination of different cations and anions giving them unique properties like low vapor pressure, thermal and chemical stability, non-flammable and nonvolatile. Its use as solvent extractors is relevant due to the ability to change its properties. Thus, the objective of this work was to evaluate ILs as alternative extractive solvents in DLLME extraction of OME and its metabolites in human plasma. Three commercially available ILs (BMImPF₆, HMImPF₆, OMImPF₆) and eight ILs synthesized in the NPPNS laboratory (C₈PF₆, C₈BF₄, C₈Cl, C₁₀PF₆, C₁₀BF₄, C10CI, C12PF6, C12CI) were evaluated. Analysis of OME and metabolites was performed on a liquid chromatograph on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm particles) chromatography column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and column Zorbax Eclipse XDB-C18 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 µm particles) and FM composed of ACN: water in the gradient elution mode (0-10 min, 5:95, 10,0-15 min, 10:90, 15.01-40 min, 30:70, v / v), flow rate of 1 mL / min and detection at 302 nm. IL-DLLME was evaluated using 400 µL plasma and a pre-treatment procedure with 500 µL of ISO. After that, 800 µL of supernatant was collected and IL-DLLME performed as the different commercial and synthesized ILs. Among the commercial ILs evaluated, the one that presented the best extraction was OMImPF6 with ACN as dispersing solvent. While among the ILs synthesized C8PF6 presented better extraction together with ISO as dispersing solvent and sodium tetraborate pH 9.5 as buffer solution. However, it was not possible to develop the proposed method, since there was not enough commercial IL that prevented the other essential tests from being performed. In relation to the ILs synthesized there were difficulties in their synthesis as presence of impurities, influence of external reagents and internal synthesis that affected the obtaining of pure ILs, fact verified by NMR analysis. However, although the objective of this work was not achieved, it was possible to obtain a relatively high recovery value, which would provide adequate quantification limits for the proposed purposes. However, the great difficulty was to obtain values of precision and accuracy within acceptable limits and suitable for quantitative analysis.

Keywords: ionic liquids, DLLME, synthesis.

3.1 Introdução

Assinada em 1992 a Declaração do Rio sobre o Ambiente e Desenvolvimento definiu metas para um desenvolvimento sustentável e estabeleceu um novo desafio científico, tecnológico e social. A área da química desempenhou um papel essencial para geração de novos agentes químicos, produtos e energia mais sustentáveis. E a partir desta necessidade de promover a sustentabilidade, surgiu o conceito da QV (ANASTAS; EGHBALI, 2010). O conceito da QV visa a sustentabilidade em nível molecular pelo desenvolvimento e utilização de novas substâncias químicas, processos, e da reciclagem de matérias primas (LENARDÃO; DABDOUB; BATISTA, 2003).

Dentre os inúmeros problemas relacionados à atividade química, podemos destacar o impacto causado pelos resíduos de solventes orgânicos voláteis, conhecidos pela sigla VOCs. A toxicidade e periculosidade desses solventes, principalmente os hidrocarbonetos clorados, são responsáveis não somente por acidentes, mas também são prejudiciais à saúde humana (POLIAKOFF et al., 2002; DeSIMONE, J.M., 2002).

Uma das áreas mais ativas da QV é a pesquisa de solventes: estes constituem um importante desafio, uma vez que são responsáveis pela maior parte do desperdício em sínteses e processos (DeSIMONE, J.M., 2002). Além disso, uma parte dos VOCs é tóxico, inflamável e/ou corrosivo; sua volatilidade e solubilidade contribuem para a poluição do ar, água e terra. A recuperação e reuso destes solventes, quando possível, são frequentemente associadas a processos que demandam gasto de energia, como por exemplo, a destilação. Ciente destes riscos e problemas, a comunidade científica deu início a pesquisas procurando soluções mais seguras e economicamente viáveis. Atualmente, como resposta aos solventes convencionais podem-se encontrar soluções como: sínteses sem solventes ou uso de solventes menos poluentes incluindo água, CO₂ supercrítico e o uso de ILs (TANAKA & TODA 2003).

Atualmente os ILs estão no cerne do meio científico e tecnológico. O grande interesse nestas substâncias deve-se às suas propriedades, que estão de acordo com os princípios da QV (TANAKA & TODA 2003).

Os ILs são compostos formados por íons, ou seja, pertencem a uma classe de sais orgânicos com ponto de fusão inferior a 100 °C que possuem comportamento semelhante aos clássicos sais fundidos (FAN; LIU; XIE, 2014). Normalmente, os ILs são uma combinação de cátions orgânicos de baixa simetria com diferentes composições de ânions orgânicos e inorgânicos. O número de associações entre cátion-ânion é proeminente, da ordem de 10¹². Este elevado número de associações permite a síntese de novos ILs com diferentes propriedades de acordo com a aplicação desejada, pois são vários os ânions e cátions disponíveis para estas diferentes composições (figura 3.1) (OLIVIER-BOURBIGOU; MAGNA, 2002; SATO, 2011).

Figura	3.1:	Tabela	de	ânions	е	cátions	mais	empregados	como	combinação	na
síntese	de IL	_S.									

				Cations	
		Anions	Amónio;	Sulfónia	Fosfània:
Al ₂ Cl ₇	AlaClin	F', CI', Br', I'	[NR _x H _(4-x)]*	[PR _x H _{[4-x)}]*	[SR _x H _(3-x)] ⁺
Sb ₃ F ₁₁	ZnCl;	trifluoracetato (CF ₃ CO ₂)	Imidazolio:	Piridinio	Pirrolidinio
SbF ₆	SnCl5	nonaflato $(CF_3(CF_2)_3SO_2^2)$, Or-a	Q	Sec. Re
SCN	NOS	trifiato $(CF_3SO_3^-)$	Tiazólio	H Triazólio	Oxazólio
BF ₄	PF _e	bis(trifluorometanosulfonii)-amida ($N(CF_{s}SO_{2})_{2})$	n Solution	, S	n An
-		dicianameto ((CN) ₂ N ⁻),	R, R1, R4, R3, R4 = H	n, alquil, alquenil, substituint	è, e derivado de éter etc.

Fonte: SATO, 2011. Reproduzido com permissão de SATO, 2011. Copyright SATO/ USP.

Os ILs possuem propriedades peculiares como: baixa pressão de vapor, elevada estabilidade térmica e química, elevada condutividade iônica, larga janela eletroquímica, não são inflamáveis e não voláteis, são miscíveis em água, bem como em solventes orgânicos de acordo com a sua estrutura (HAN; ROW, 2010). O aumento da cadeia alquílica (cátion) leva à diminuição da densidade e aumento da viscosidade e hidrofobicidade dos ILs (LIU et al., 2003). A principal característica dos ILs é a possibilidade de modelar distintas propriedades físicas, químicas e

térmicas em conformidade com a combinação dos cátions e ânions adotados (LIU; JIANG; JÖNSSON, 2005).

A pressão de vapor negligenciável torna o IL inodoro e, de certo modo, não volátil em condições normais, por isso o IL é considerado benéfico ao meio ambiente. O ponto de fusão é a mais importante característica que define a classe destes compostos, sendo que ponto de fusão abaixo da temperatura ambiente é desejável para maioria das aplicações. Os cátions imidazólio produzem ILs com relativo baixo ponto de fusão quando comparados aos cátions derivados de bases nitrogenadas simples. Outra característica importante é a alta estabilidade térmica à temperaturas superiores a 400 °C. Assim como nos sais fundidos os ILs também apresentam uma elevada quantidade de íons móveis no interior do líquido. Basicamente o líquido é composto exclusivamente por íons móveis que resulta em condutividade muito elevadas em relação às soluções comuns. Outra peculiaridade dos ILs é a janela eletroquímica, definida pela faixa de potencial onde um eletrólito não sofre processos de oxidação ou redução sobre um eletrodo. Em outras palavras, é a faixa de potencial em que o eletrólito é estável eletroquimicamente. Os ILs, assim como os sais fundidos, têm como característica uma grande janela eletroquímica, variando entre 2,0-5,0 V. Essas propriedades dos ILs foram principalmente aplicadas em sistemas de eletrodeposição e baterias. Todas essas particularidades únicas tornaram os ILs o destaque entre as possibilidades de solventes verdes alternativos em diferentes campos da indústria química.

A utilização de ILs como solventes extratores é interessante devido à possibilidadede alterar suas propriedades (viscosidade, tensão superficial e hidrofilicidade/hidrofobicidade). A mudança do solvente tradicional por um solvente verde não significa somente torná-lo um processo de extração menos poluente mas, também pode desencadear mudanças na reação, o que pode afetar diretamente o rendimento da extração, bem como a seletividade ou pode ainda aumentar a pureza e/ou reduzir a quantidade de resíduos (CASSOL, 2007).

Do ponto de vista químico, nos processos de extração é importante oconhecimento da composição, das propriedades e das interações mútuas entre osdiferentes componentes. Os ILs são materiais promissores para esta aplicação, pois através do estudo de sua estrutura e conhecimento de suas propriedades pode-se desenvolver materiais que sejam ajustáveis às condições de trabalho e às necessidades requeridas durante a extração dos analitos de interesse (DEETLEFS et al., 2005; ZHAO; XIA; MA, 2005). Sendo assim, este trabalho visou a utilização dos ILs como solventes extratores alternativos na extração por DLLME do OME e seus metabólitos em plasma humano.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para determinação do OME e seus metabólitos (OMES e OS) em plasma por HPLC-DAD utilizando a IL-DLLME como técnica de preparo de amostra.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise do OME e metabólitos por HPLC-DAD;
- Avaliar a IL-DLLME como técnica de preparo de amostra alternativa e miniaturizada, para a extração do OME e metabólitos em plasma;
- Avaliar os parâmetros da IL-DLLME: tipo de solvente dispersor, tipo de IL extrator, força iônica e pH da amostra;
- Comparar a eficiência de extração utilizando IL sintetizados e IL comerciais.

3. Material, Casuística e Métodos

3.1 Equipamentos

A análise do OME foi realizada em um cromatógrafo a líquido modelo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por uma bomba LC-20T, injetor SIL-10AF, forno CTO-20A, detector SPD-M20A, operando em 302 nm, controladora CBM-20A, desgaseificador DGU-20A5R, válvula LPGE Kit e software LC Solutions – marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Para o preparo das soluções foi empregada água ultrapura obtida do sistema Master Modelo MS 2000 (Gehaka, Brasil). A balança analítica utilizada nos procedimentos de pesagem foi da marca Sartorius, modelo MSU225P (Goettingen, Alemanha). A homogeneização das soluções foi feita em um agitador de tubos Ika (*vórtex*), modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha). Para a realização das extrações foi utilizada uma centrifuga Hitachi, modelo HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão) e um agitador do tipo *vibrax* Ika, modelo VXR basic (Staufen, Alemanha).

Para a síntese dos ILs foi utilizado um micro-ondas marca Anton-Paar, modelo Monowave 300 para as reações. As análises de ressonância magnética nuclear foram feitas em aparelhos da marca Bruker, operando em 300 MHz e 400 MHz.

3.2 Reagentes e solventes

Foram utilizados os mesmos reagentes descritos no capítulo 1 item 3.2.

Também foram utilizados os solventes orgânicos (grau HPLC) acetonitrila, metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), acetona (Macron Chemicals, Center Valley, EUA) e álcool isopropílico (Sigma, St. Louis, EUA).

Para a síntese dos ILs foram empregados os haloalcanos: 1-Clorooctano, 1-Clorodecano e 1-Clorododecano (marca Sigma-Aldrich, com purezas ≥ 99, 98 e 97%, respectivamente) e 1-Metilimidazol (Sigmal-Aldrich, pureza 99%). Para a etapa de troca iônica, foram utilizados os sais hexafluorofosfato de sódio e tetrafluoroborato de sódio (Sigma-Aldrich, pureza 98%).

3.3 Condições cromatográficas

A avaliação das condições cromatográficas foi realizada pela variação dos parâmetros de composição da FM. Assim, foram avaliadas FMs compostas por ACN e água no modo eluição por gradiente em diferentes proporções: FM 1 (0-10 min 5:95; 10-23 min 10:90; 23,01-50 min 30:70, v/v), FM 2 (0-10 min 5:95; 10,0-15 min 10:90; 15,01-35 min 30:70, v/v), FM 3 (0-10 min 5:95; 10,01-15 min 10:90; 15,01-40 min 30:70, v/v), FM 4 (0-15 min 5:95; 15,01-20 min 20:80; 20,01-45 min 30:70, v/v). A condição que proporcionou uma análise adequada em relação ao tempo de retenção e eficiência foi selecionada para determinação do OME e metabólitos.

3.4 Soluções padrão de OME e metabólitos e padrão interno

Os padrões analíticos de OME, HOME, OMES, OS e PI foram adquiridos e preparados conforme descrito no capítulo1 item 3.2 e capítulo 2 item 3.5.

As soluções estoque do OME e metabólitos foram preparadas conforme descrito no capítulo 1 item 3.4.

3.5 Amostras de Plasma

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP, processo 6695/2010 (anexos). Para o desenvolvimento do método bioanalítico foram empregadas amostras de plasma obtidas do banco de sangue do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto de doadores de sangue voluntários sadios. Foram aceitas bolsas de plasma livres do fármaco em questão (plasma branco).

3.6 Seleção dos ILs comerciais

Com base na literatura três ILs comercializados pela empresa Sigma-Aldrich foram selecionados para serem avaliados como solventes extratores na IL-DLLME. Os seguintes ILs foram selecionados: 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (BMImPF₆), 1-hexil-3-metilimidazóliohexafluorofosfato (HMImPF₆) e 1-metil-3-octilhexafluorofosfato (OMImPF₆), pois apresentaram boa extração de fármacos de carácter básico, característica semelhante à apresentada pelo OME (NEVADO et al., 2014; GONG; ZHU, 2015; DE BOECK et al., 2017b).

3.7 Síntese de ILs

Com base nos testes realizados com os ILs comerciais e nos dados disponíveis na literatura foram sintetizados oito ILs de cadeia imidazólica longa, ou seja, com maior número de carbonos na parte catiônica. Tais líquidos foram selecionados uma vez que, nos testes com os ILs comerciais, os ILs de cadeia mais longa demonstraram melhor eficiência de extração.

A síntese dos ILs foi realizada no laboratório NPPNS (Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos) pelo aluno de mestrado Franco Jazon Caires sob orientação e supervisão do prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki. A síntese dos ILs compreendeu duas etapas principais: a primeira etapa sendo a de alquilação da amina escolhida, através de uma reação de substituição nucleofílica, com a formação de um IL intermediário, sendo este um cloreto ou brometo, dependendo do haleto de alquila empregado na alquilação. A segunda etapa, correspondeu ao estágio de troca iônica ou reação de metátese, que promove a troca do ânion haleto (Cl⁻ ou Br⁻) pelo ânion desejado (PF₆⁻ ou BF₄⁻), em seguida o IL foi filtrado para remoção do sal do haleto e o IL purificado, resultando no IL final desejado (AUPOIX; PÉGOT; VO-THANH, 2010).

A síntese dos ILs utilizados no estudo baseou-se em metodologia descrita por (AUPOIX; PÉGOT; VO-THANH, 2010). Assim, em um vial de micro-ondas de 10 mL, foram colocadas quantidades equimolares (25 mM) dos reagentes 1metilimidazol e dos cloroalcanos disponíveis. A reação ocorreu com a mistura dos reagentes sob aquecimento a 150 °C por 45 min, em micro-ondas. Posteriormente, a mistura reacional foi lavada com 10 mL de acetato de etila por três vezes, até a remoção do material de partida não reagido, em rotoevaporador. Em seguida, o produto obtido foi diluído com 10 mL de diclorometano e purificado através de agitação em carvão ativado. Após agitação por 16 horas, a mistura foi filtrada em papel-filtro e sílica e o solvente removido em rotoevaporador. Assim, após estas etapas foi obtido um IL intermediário correspondente ao cloroalcano utilizado, contendo cloro como contra-íon.

Para obter os ILs com os contra-íons PF₆ e BF₄, os produtos intermediários obtidos foram submetidos a reação de metátese em micro-ondas com os sais de hexafluorofosfato de sódio ou tetrafluoroborato de sódio. Portanto, em vial de micro-ondas de 10 mL foram colocadas quantidades equimolares (4 mM) dos ILs intermediários e sais correspondentes. A reação ocorreu com o aquecimento da mistura a 160 °C por 45 min, em micro-ondas. Logo após o término das reações, os produtos foram diluídos em diclorometano, filtrados em papel-filtro e o solvente removido em rotoevaporador, obtendo assim os IIs utilizados neste estudo.

Assim, foram sintetizados os seguintes IIs: 1-octil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (C₈PF₆), 1-octil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato (C₈BF₄), cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio (C₈CI), 1-decil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (C₁₀PF₆), 1-decil-3-metilimidazol tetrafluoroborato (C₁₀BF₄), cloreto de 1-decil-3-metilimidazol (C₁₀CI), 1-dodecil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (C₁₂PF₆), cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazol (C₁₂CI).
3.8 Extração por IL-DLLME

Os testes iniciais foram conduzidos com os parâmetros otimizados no delineamento descrito no capítulo II item 4.2.4. Assim, a extração foi realizada com 400 μ L de plasma previamente centrifugados, fortificados com 40 μ L da solução de OME e metabólitos e 40 μ L da solução de PI e agitados em *vórtex* por 30 segundos. Em seguida, 500 μ L de solvente orgânico a -20 °C foi adicionado e os tubos foram agitados por 2 minutos a 1500 rpm com o auxílio do *vibrax*. Logo após, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2300 x *g* a 4°C, o sobrenadante livre de proteínas foi recuperado e transferido para um tubo de fundo cônico. Ao final foram obtidos cerca de 800 μ L de sobrenadante e realizada a IL-DLLME segundo o procedimento descrito na figura 3.2.

Figura 3.2: Fluxograma referente ao procedimento de extração do OME e metabólitos em amostras de plasma por IL-DLLME.



Fonte: Autoria própria.

3.9 Avaliação dos ILs por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

Foi realizada a análise espectroscópica dos ILs comerciais e sintetizados por ressonância magnética nuclear para determinação dos espectros de carbono e hidrogênio dos ILs. Esta análise permite a identificação dos ILs, além de verificar a pureza dos mesmos, tanto comerciais quanto sintéticos (Paiva, 2010).

4. Resultados e Discussões

4.1 Determinação das condições analíticas

Para composição da FM foram avaliadas diferentes proporções de solvente com eluição por gradiente com o objetivo de obter um menor tempo de corrida cromatográfica e melhor separação dos analitos. Assim, após a avaliação de diferentes composições de FM, a condição que resultou em uma análise adequada em relação ao tempo de retenção e eficiência do OME e metabólitos foi a FM composta por ACN:água (0-10 min, 5:95; 10,0-15 min, 10:90; 15,01-40 min, 30:70, v/v), vazão de 1 mL/min e detecção em 302 nm (figura 3.3). As condições cromatográficas descritas na tabela 3.1 foram selecionadas, sendo possível a eluição do OME em 16,7 min, OMES em 18,6 min, PI em 20,1 min e OS em 22,8 min.

Tabela 3.1: Condições cromatográficas para determinação do OME, OMES, PI e OS.

Parâmetros	Condições
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse XDB - C18 (25 cm x
_	4,6 mm, partículas de 5 µm)
Coluna de guarda	Zorbax Eclipse XDB - C18 (12,5 mm x
_	4,6 mm, partículas de 5 μm)
Composição da FM	ACN: H ₂ O
Vazão da FM	1,0 mL/min
Temperatura da coluna	40 °C
Tempo total de corrida	40 min
cromatográfica	

Fonte: Própria autoria.

Figura 3.3: Cromatograma referente à análise do OME e metabólitos em solução padrão (10 µg/mL). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2. Os picos com o tempo de 16,7; 18,60; 20,4; 23,4 min correspondem a OME, OMES, PI e OS respectivamente.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

4.2 Avaliação dos ILs comerciais

4.2.1 Seleção do solvente dispersor

Foram avaliados quatro solventes orgânicos como solventes dispersores e agentes para precipitação de proteínas plasmáticas: MEOH, ACE, ACN, ISO. A utilização de solventes orgânicos como agentes precipitantes proteicos é conveniente, pois são usados também como solventes dispersores na IL-DLLME (XIAO et al., 2013; FARAJZADEH; KHORRAM; PAZHOHAN, 2016; FERNANDEZ et al., 2016).

Na figura 3.4 é possível observar que a ACN foi o solvente orgânico que proporcionou os melhores valores de recuperação do OME e metabólitos com p<0,05 de significância em relação ao MEOH, assim a ACN foi o solvente utilizado nos ensaios posteriores.

Figura 3.4: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas plasmáticas e solventes dispersores para extração do OME e metabólitos por IL-DLLME, (p<0,05). Condições da IL-DLLME: 500 µL solvente dispersor, 2,5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de cada IL.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Própria autoria.

4.2.2 Seleção do IL comercial

A utilização de ILs como solventes extratores é interessante devido a possibilidade de alterar suas propriedades (viscosidade e tensão superficial) para selecionar o sistema mais apropriado (SPIETELUN et al., 2014; NIAZI, KHORSHIDI, GHAEMMAGHAMI, 2015). Seguindo estas características foram avaliados os ILs comercias: 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (BMImPF₆), 1-hexil-3-metilimidazóliohexafluorofosfato (HMImPF₆) е 1-metil-3-octilhexafluorofosfato (OMImPF₆). Entre os ILs avaliados, todos extraíram o OME, metabólitos e o PI, porém o OMImPF₆ proporcionou melhores valores de recuperação frente aos demais ILs testados, sendo assim este foi selecionado como IL extrator (figura 3.5). As figuras 3.6A e 3.6B mostram os cromatogramas referentes à analise cromatográfica do IL OMImPF6 puro (figura 3.6 A) e do OME e metabólitos após extração com o IL em plasma (figura 3.6B). As condições da extração por IL-DLLME foram as mesmas descritas anteriormente com uso da ACN como solvente dispersor.

Figura 3.5: Influência do tipo de IL comercial na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME, (*p*< 0,001). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Autoria própria.

Figura 3.6: Cromatograma referente à análise do IL OMImPF₆ puro (A) e extração do OME e metabólitos em plasma (B) em solução padrão (10µg/mL). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2. Em B os picos com o tempo de 18,7; 20,0; 20,8; 21,1 min correspondem a OME, OMES, PI e OS respectivamente.





Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

4.2.3 Avaliação os ILs comerciais por RMN

A RMN é um método espectroscópico que fornece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado. O estudo dos núcleos de carbono e hidrogênio por meio da RMN é importante para determinar as estruturas de moléculas orgânicas. Assim, é possível determinar a estrutura completa de composto desconhecido. Os espectros de carbono e hidrogênio determinam o número de átomos de cada elemento e identificam os tipos de átomos presentes no composto. Portanto, a RMN oferece informações diretas sobre o esqueleto de carbono e hidrogênio da molécula o que permite identificá-la. Para identificar o ânion de ligação do IL foi realizado o monitoramento do íon de flúor. Assim, foi realizada a análise por RMN dos ILs comerciais adquiridos para verificar a pureza dos mesmos e se correspondiam aos ILs descritos nos rótulos, figuras 3.7 a 3.15.



Figura 3.8: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de BMImPF₆.





Figura 3.9: Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de BMImPF₆.

Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-400.



Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-500.



Figura 3.13: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de OMImPF₆.



Figura 3.14: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de OMImPF₆.



Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-400.

A análise por RMN foi realizada com o intuito de verificar a pureza e autenticidade dos ILs adquiridos comercialmente. Assim, ao final das análises estes quesitos foram comprovados. A RMN da cadeia carbônica demonstrou o número de carbonos equivalente a cada IL, BMIm, HMIm e OMIm com 4, 6 e 8 carbonos respectivamente. Além disso, foi verificado o teor de pureza dos ILs adquiridos e comprovada sua autenticidade. Devido a pequena quantidade disponível do IL comercial selecionado, OMImPF₆, além do alto custo para adquirir nova unidade, bem como, demora no processo de importação, não foi possível o desenvolvimento e validação completa do método proposto. Por isso foi considerada a obtenção de IL sintetizados para avaliar a IL-DLLME do OME e seus metabólitos.

4.3 Avaliação dos ILs sintetizados

4.3.1 Seleção do solvente dispersor

Como solventes dispersores e agentes para precipitação de proteínas foram avaliados os seguintes solventes orgânicos: ACN, ACE, ISO, MEOH. Na figura 3.16 é possível observar que os solventes ISO e MEOH apresentaram recuperações

próximas, porém o ISO foi o solvente de escolha por apresentar precipitação de proteínas mais límpido quando comparado ao MEOH. Assim o ISO foi o solvente orgânico utilizado nos ensaios posteriores. É possível que, devido ao IL ser sintetizado, este tenha interagido de modo distinto com o solvente dispersor se comparado ao IL comercial.

Figura 3.16: Avaliação do solvente orgânico para precipitação das proteínas plasmáticas e solventes dispersores para extração do OME e metabólitos por IL-DLLME. Condições da IL-DLLME: 500 µL solvente dispersor, 2,5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 mM pH 9,5, 100 µL de cada IL.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5. Autoria própria.

4.3.2 Seleção do IL sintetizado

Foram avaliados os ILs sintetizados: 1-octil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (C₈PF₆), 1-octil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato (C₈BF₄), cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio (C₈CI), 1-decil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (C₁₀PF₆), 1-decil-3-metilimidazol tetrafluoroborato (C₁₀BF₄), cloreto de 1-decil-3-metilimidazol (C₁₀CI), 1-dodecil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (C₁₂PF₆), cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazol (C₁₂CI).

Entre os ILs avaliados, a maioria não apresentou boa extração do OME, metabólitos e PI. Os ILs C₈PF₆ e C₁₂PF₆ proporcionaram melhores valores de recuperação frente aos demais ILs testados e conseguiram extrair os analitos a partir da amostra plasmática, sendo assim, estes foram selecionados como ILs

extratores para testes posteriores (figura 3.17). As condições da IL-DLLME foram

as mesmas descritas anteriormente com uso de ISO como solvente dispersor.

Figura 3.17: Influência do tipo de IL sintetizado na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME, Solvente dispersor: ISO. $C_{12}PF_6$ foi significativo em relação ao C_8CI , $C_{10}CI$ e $C_{12}CI$, (*p*< 0,001). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5.

Posteriormente foram reavaliados os dois ILs, C₈PF₆ e C₁₂PF₆, que demonstraram melhor porcentagem de recuperação. Novos testes de extração foram realizados com ambos os ILs e também foram avaliados novamente os solventes dispersores: ACN, ACE, ISO, MEOH (figura 3.18). Este teste foi necessário para selecionar apenas um IL e verificar a pureza de pico e se não havia coeluição de componentes com os analitos avaliados.

Figura 3.18: Influência do IL sintetizado na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME (p < 0,05). Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.



Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5.

Entretanto, foi observado que houve coeluição de interferentes do IL C₁₂PF₆, nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse (figura 3.19), além de apresentar baixa pureza dos picos dos analitos. Assim, após inúmeros testes, foi descartado o C₁₂PF₆ como IL extrator. Portanto, o IL sintetizado C₈PF₆ foi escolhido como IL extrator e novo lote foi sintetizado para execução dos novos testes.

Figura 3.19: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em plasma. Solvente extrator: IL C₁₂PF₆Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.Os picos com o tempo de 19,7; 23,9; 24,8 e 28,9 min correspondem a OME, OMES, PI e OS respectivamente.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

4.3.3 Avaliação da influência do pH e composição da solução tampão

A eficiência da extração dos analitos pode ser afetada pelo pH da fase aquosa, o que influencia diretamente os valores de recuperação. Assim, o pH da amostra deve considerar as propriedades físico-químicas do analito, como seu pKa estar ajustado para que o analito permaneça em sua forma molecular, concentrando-se na fase extratora (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; ESCUDERO et al., 2013).

O OME, uma base fraca, permanece na sua forma não ionizada em meio alcalino, assim é melhor extraído pelo solvente orgânico. Portanto, esta influência dos valores de pH, bem como o tipo de solução tampão foi avaliada pela adição de diferentes soluções tampão na faixa de pH de 7 a 11 (tabela 3.2). Assim a extração foi realizada com ISO como solvente dispersor e C₈PF₆ como IL extrator.

Tabela 3.2: Soluções tampão avaliadas na faixa de pH 7-11.

рН	Solução tampão
7	Fosfato de potássio monobásico
8,5	Formiato de amônio
8,5	Fosfato de potássio dibásico
9	Tetraborato de sódio
11	Acetato de amônio

Fonte: Própria autoria.

Após a execução da IL-DLLME para avaliação do pH da fase aquosa com soluções tamponadas na faixa de pH 7 a 11 os testes se apresentaram inconclusivos, pois foram observados muitos picos interferentes do IL coeluindo com os picos dos padrões analisado sapós extração em plasma sendo impossível identificar os picos dos analitos alvo (figura 3.20).

Figura 3.20: Cromatograma referente a extração do OME e metabólitos em plasma. Solvente extrator: IL C₈PF₆, pH 9. Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.



Fonte: Análise de dados por Software Labsolutions.

Além da dificuldade em relação a análise cromatográfica com o IL, também foi observado cristalização do IL sintetizado. Assim, o IL foi submetido ao aquecimento para diluição dos cristais formados. Entretanto, foi observada mudança na coloração do IL de amarelo translúcido para amarelo escuro opaco. Portanto, foram realizadas análises por RMN para verificar a pureza dos ILs sintetizados e utilizados nos testes.

4.3.4 Avaliação os ILs sintetizados por RMN

Foram realizadas análises por RMN, método espectroscópico para obter informações sobre a estrutura completa do composto analisado. Assim, foi realizada a análise dos espectros de carbono e hidrogênio para identificar o IL e verificar sua pureza. Porém, após a análise do último lote de IL sintetizado e avaliado nos testes sobre a influência do pH e composição da solução tampão, foi verificada a presença de impurezas.

As figuras 3.21 a 3.23 apresentam os espectros da amostra analisada de IL do primeiro lote sintetizado e utilizado nos testes iniciais, para seleção de solventes dispersores e seleção do IL extrator, amostras que apresentaram boa eficiência de extração. Enquanto as figuras 3.24 a 3.26 apresentam análise de C, H e F de uma

amostra do último lote de IL sintetizado e utilizado no teste para avaliação da influência do pH e composição da solução tampão, em destaque os picos de impurezas apresentados nesta amostra de IL testada.



Figura 3.21: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆.

Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-400.



Figura 3.22: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆.

Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-400.

Figura 3.23: Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆.



Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-500.



Impurezas detectadas após análise de amostra.

Figura 3.24: Espectro de RMN de ¹³C(1400 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆.

Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-400.



Figura 3.26: Espectro de RMN de ¹⁹F (500 MHz, CDCl₃) de C₈PF₆.

Fonte: Análise de substâncias por Avance DRX-500.

Após a realização da análise por RMN do último lote de C₈PF₆ sintetizado foram observados vários espectros que não correspondem a estrutura molecular do IL original, espectros que não foram observados nas demais análises. Assim, o IL foi novamente submetido a etapa de lavagem com diclorometano e purificação através da agitação com carvão ativado e posterior filtração com papel-filtro e sílica e o solvente removido por rotoevaporação.

O processo de síntese de IL é complexo e se não realizado de modo adequado pode levar a geração de ILs de baixa qualidade com a presença de impurezas, bem como excesso de reagentes sobressalentes da reação de síntese. A utilização do micro-ondas para síntese dos ILs propostos é um fator que acelera o processo de síntese em muitas horas, porém existe uma dificuldade de controlar as condições da reação, principalmente no que tange a geração de focos de calor, que pode favorecer a formação de ILs de baixa qualidade (LÉVÊQUE et al., 2007). Durante a etapa de síntese houve troca do aparelho de micro-ondas utilizado para síntese dos IL, devido a problemas técnicos no aparelho inicial das sínteses, tal troca pode ter afetado o processo de síntese o que pode ter alterado a qualidade do IL sintetizado.

4.3.4 Avaliação da influência da composição da solução tampão

Após a repurificação do IL foi realizado novo teste nos valores de pH 8,5 e 9,0 (tabela 3.3), baseado nos resultados obtidos no capítulo 2 item 4.3.1, além das propriedades físico-químicas do OME (BOSCH OJEDA; SÁNCHEZ ROJAS, 2009; CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; ESCUDERO et al., 2013).

Tabela 3.3: Soluções tampão testadas para extração do OME por IL-DLLME.

рН	Solução tampão
8,5	Formiato de amônio
8,5	Fosfato de potássio dibásico
9	Tetraborato de sódio

Fonte: Própria autoria.

As três soluções tampão foram novamente avaliadas juntamente com os quatro solventes testados anteriormente, ACE, ACN, ISO, MEOH, a fim de se verificar se as variações da composição das soluções juntamente com a variação dos solventes dispersores teriam influência sobre a capacidade de extração do IL C₈PF₆. A ACE não apresentou picos cromatográficos conclusivos assim foi excluída para análise estatística. Além disso, como foi sintetizado novo lote de IL, optou-se por testar novamente o IL, pois foi observada diferença entre os lotes de ILs sintetizados e purificados quanto a impurezas e picos cromatográficos interferentes.

Figura 3.27: Influência do pH da fase aquosa na extração do OME e metabólitos por IL-DLLME em plasma. Condições cromatográficas: vide tabela 3.2.



Soluções tampão testadas

Fonte: Análise de dados por software GraphPad Prism 5.

Após o teste com os quatro solventes dispersores, ACE, ACN, ISO, MEOH, foram observados cromatogramas mais limpos em relação a picos de substâncias desconhecidas eluindo com os picos dos analitos determinados. Entretanto, a ACE, apresentou baixa porcentagem de extração, sendo que em algumas replicatas não foi visualizado a presença dos analitos como todos os solventes dispersores.

Quanto a análise das soluções tampão estas se apresentaram, juntamente com os solventes extrator e dispersor, com boa extração e valores de recuperação superiores a 15%.

Foi observado que a solução tampão composta por fosfato de potássio dibásico pH 8,5 apresentou melhores valores de recuperação frente a extração dos analitos, quando comparada as soluções tampão formiato de amônio e tetraborato de sódio. Entretanto, não houve diferença significativa entre os solventes dispersores, mas o ISO apresentou menor desvio padrão em relação aos demais solventes dispersores. Portanto, foram selecionados para testes posteriores a solução tampão composta por fosfato de potássio dibásico pH 8,5 e o solvente dispersor ISO.

4.3.4 Teste de linearidade

A linearidade é a capacidade do método de confirmar que os resultados alcançados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

A linearidade do método foi avaliada em amostras de plasma fortificadas com uma mistura de OME, OMES, OS e PI nas concentrações plasmáticas de 20-1000 ng/mL e 500 ng/mL, respectivamente, em quintuplicata.

O gráfico de linearidade foi construído plotando-se no eixo das abcissas os valores de concentração do OME e no eixo das ordenadas, a razão entre a área dos picos obtidos para o OME e a área do PI. A correlação linear entre as concentrações nominais e as respectivas razões de área do sinal cromatográfico do OME e PI foi avaliada por análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Entretanto, foi verificado por cálculos estatísticos que o método foi não linear, com valor de coeficiente de correlação inferior a 0,5. Também foi observado que o método não apresenta exatidão e precisão, pois foram obtidos valores superiores a 25%, quando calculados os valores de CV (%) e EPR (%) para precisão e exatidão intraensaios e interensaios (ANVISA, 2012).

Portanto, apesar de ser possível a extração dos analitos, o IL C₈PF₆ em associação com o solvente dispersor ISO e a solução tampão, fosfato de potássio dibásico pH 8,5, o método que não apresentou repetibilidade dos resultados, nem exatidão.

Assim, embora os ILs sejam solventes verdes e seu emprego seja interessante por reduzir a quantidade de solventes orgânicos utilizados e consequentemente diminuir a geração de resíduos, eles não demonstraram boa exatidão e precisão ao serem empregados como solventes extratores (CASSOL, 2007) Assim, o método desenvolvido com o IL selecionado apresentou valor de recuperação adequado para análises quantitativas mas, não pode ser validado para aplicações posteriores.

4.4 Comparação entre IL comercial e IL sintetizado

Foram avaliados três ILs comerciais, BMImPF₆, HMImPF₆ e OMImPF₆, sendo que todos apresentaram recuperação do OME e metabólitos, 6%, 5,5% e

50%, respectivamente, porém o OMImPF₆ proporcionou melhores valores de recuperação dentre os ILs comerciais testados, 50%. Entre os ILs sintetizados, C₈PF₆, C₈BF₄, C₈CI, C₁₀PF₆, C₁₀BF₄, C₁₀CI, C₁₂PF₆, C₁₂CI o C₈PF₆ foi o IL que apresentou melhor valor de recuperação.

Entretanto, tanto com o IL comercial quanto com o IL sintetizado não foi possível desenvolver um método de extração. No IL comercial o desenvolvimento do teste de linearidade não foi possível devido à quantidade escassa de IL para efetuarmos este teste. Em ambas as seleções de IL extratores, tanto comerciais quanto sintetizados, o IL que demonstrou melhor poder de extração foi de cadeia catiônica composta por oito carbonos. Houve distinção da nomenclatura dada aos ILs, apesar de possuírem mesma estrutura molecular. Assim, os ILs OMImPF₆, e C₈PF₆ apresentam a mesma estrutura molecular, portanto são os mesmos compostos, apenas diferenciando entre eles sua obtenção, um foi obtido comercialmente e ou outro sintetizado no laboratório, respectivamente.

5.0 Conclusão

No presente estudo foram avaliados ILs comerciais e sintetizados para a extração do OME e metabólitos em amostras de plasma empregando a IL-DLLME. Entretanto, devido à pequena quantidade de IL comercial disponível e seu alto custo não foi possível a execução de todos os testes necessários para o desenvolvimento e validação do método. Assim, foram avaliados ILs sintetizados no NPPNS para avaliar a IL-DLLME do OME e seus metabólitos.

Vários ILs foram sintetizados e aplicados para extração, porém dificuldades na síntese e na obtenção de produtos puros para aplicação analítica impossibilitaram o desenvolvimento de um método com linearidade, precisão e exatidão satisfatórios para aplicação em análises quantitativas dos pacientes. Apesar de a literatura demonstrar trabalhos como de (PADRÓ et al., 2013) que realizaram a aplicação do método com extração de analitos por IL-DLLME a partir de amostras de plasma, no presente estudo não foi possível obter resultados semelhantes, porém a proposta de aplicar IL como solventes extratores é válida e deve ser estudada com maior profundidade. Ainda que o objetivo deste trabalho não tenha sido alcançado com sucesso pode-se prever que, com adequações na rota sintética e purificação dos ILs, seja possível desenvolver métodos analíticos utilizando o IL como solvente alternativo aos clorados na execução da DLLME.

"Aprender é à única coisa de que à mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende." Leonardo da Vinci

CONCLUSÃO FINAL

No presente estudo foram desenvolvidos e validados dois métodos para quantificação do OME e metabólitos em amostras de plasma de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica empregando a LLE por HPLC-UV e a OS-DLLME por LC-MS/MS. Ambos foram lineares, precisos e exatos com limite de quantificação 20 ng/mL.

Apesar da OS-DLLME ser uma técnica nova e ainda ter pouca aplicação em amostras complexas, como o plasma, e que necessita de um pré-tratamento, foi possível obter resultados com perfil semelhante aos valores atingidos no método desenvolvido por LLE, a técnica *standard gold,* mais aplicada para extração do OME e metabólitos em amostras complexas. Portanto, o método desenvolvido por OS-DLLME pode substituir a LLE, como técnica de preparo de amostra, pois apresenta semelhante eficiência de extração e boa recuperação dos analitos para quantificação, além de vantagens como o menor consumo de amostra biológica (400 µL), menor volume de solvente extrator (120 µL) e dispersor (500 µL), além de menor tempo de execução.

Neste trabalho também foi proposto o desenvolvimento de um método vanguardista utilizando ILs como, solventes alternativos com propriedades singulares que foram empregados como solventes extratores do OME e seus metabólitos em amostras de plasma humano por DLLME. Foram avaliados ILs comerciais e ILs sintetizados, a partir de uma colaboração com o NPPNS. Após testes foi determinado que o IL com maior cadeia catiônica, composta por oito carbonos, foi a que apresentou melhor valor de recuperação. Diversos empecilhos como quantidade limitada de amostra de IL comercial, assim como dificuldades no processo de síntese e presença de impurezas e problemas reacionais, impossibilitaram o desenvolvimento do método proposto inicialmente. Entretanto, com os resultados obtidos conclui-se que é possível o desenvolvimento do método, posterior validação e aplicação em amostras reais de pacientes com ajustes tanto na síntese do IL selecionado, tal como ajustes para alcançar valores de precisão e exatidão dentro do limite preconizado pela agência regulatória ANVISA.

"O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo." Winston Churchill

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 177, p. 267–273, 2015.

AHMED, S.; ATIA, N. N. Simultaneous determination of triple therapy for Helicobacter pylori in human plasma by reversed phase chromatography with online wavelength switching. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, n. PC, p. 1380–1387, 2015a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.024>.

AHMED, S.; ATIA, N. N. Simultaneous determination of triple therapy for Helicobacter pylori in human plasma by reversed phase chromatography with online wavelength switching. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2015b.

ALMANSA-LO, E. M.; BOSQUE-, J. M.; GA, L.; CUADROS-RODR, L. Calibration in chemical measurement processes . II . A methodological approach. v. 20, n. 11, p. 620–636, 2001.

ALVES. Beribéri Pós Bypass Gástrico A PREVALÊNCIA DA OBESIDADE VEM aumentando no. Arq Bras Endocrinol Metab, v. 50, 2006.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society** reviews, v. 39, n. 1, p. 301–312, jan. 2010.

AUPOIX, A.; PÉGOT, B.; VO-THANH, G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. **Tetrahedron**, v. 66, n. 6, p. 1352–1356, 2010.

AZRAN, C.; WOLK, O.; ZUR, M.; FINE-SHAMIR, N.; SHAKED, G.; CZEIGER, D.; SEBBAG, G.; KISTER, O.; LANGGUTH, P.; DAHAN, A. Oral drug therapy following bariatric surgery: an overview of fundamentals, literature and clinical recommendationsObesity Reviews, 2016.

BEHBAHANI, M.; NAJAFI, F.; BAGHERI, S.; BOJDI, M. K.; SALARIAN, M.; BAGHERI, A. Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 25–31, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.088>.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEE, E. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, n. 1, p. 1–9, 2006. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306009411.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M. J.; CARDA-BROCH, S. Ionic liquids in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 6–18, 2008.

BERTON, P.; WUILLOUD, R. G. Highly selective ionic liquid-based microextraction method for sensitive trace cobalt determination in environmental and biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 2, p. 155–162, 2010.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BHARATHI, D. V.; HOTHA, K. K.; JAGADEESH, B.; CHATKI, P. K.; THRIVENI, K.; MULLANGI, R.; NAIDU, A. Simultaneous estimation of four proton pump inhibitors - Lansoprazole, omeprazole, pantoprazole and rabeprazole: Development of a novel generic HPLC-UV method and its application to clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 7, p. 732–739, 2009.

BORGES, K. B.; PUPO, M. T.; DE FREITAS, L. A. P.; BONATO, P. S. Box-Behnken design for the optimization of an enantioselective method for the simultaneous analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE. **Electrophoresis**, v. 30, n. 16, p. 2874–2881, 2009.

BOSCH OJEDA, C.; SÁNCHEZ ROJAS, F. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review. **Chromatographia**, v. 69, n. 11–12, p. 1149–1159, 2009. Disponível em: .">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67649908665&partnerID=40&md5=a47b824273c11d74114878dfc0d6f938>.

BUENO, J. S.; SILVA, B. J. G.; QUEIROZ, M. E. C. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, n. 1, p. 55–62, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.004>.

CASS, Q. B.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; PEDRAZZOLI, J. Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 798, n. 2, p. 275–281, 2003.

CASSOL, C. C. Líquidos lônicos em Processos de Extração Seletiva de Compostos Aromáticos, Nitrogenados e Sulfurados em Frações do Petróleo. p. 89, 2007.

COLLARES-PELIZARO, R. V. A.; SANTOS, J. S.; NONINO, C. B.; GAITANI, C. M.; SALGADO, W. Omeprazole Absorption and Fasting Gastrinemia After Roux-en-Y Gastric Bypass. **Obesity Surgery**, 2017.

DE BOECK, M.; MISSOTTEN, S.; DEHAEN, W.; TYTGAT, J.; CUYPERS, E. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction procedure combined with LC–MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepinelike hypnotics in whole blood. **Forensic Science International**, v. 274, p. 44–54, 2017a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.026>.

DE BOECK, M.; MISSOTTEN, S.; DEHAEN, W.; TYTGAT, J.; CUYPERS, E. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid???liquid microextraction procedure combined with LC???MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepinelike hypnotics in whole blood. **Forensic Science International**, v. 274, p. 44–54, 2017b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.026>.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. D. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S.

Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

DE SMET, J.; BOUSSERY, K.; DE COCK, P.; DE PAEPE, P.; REMON, J. P.; VAN WINCKEL, M.; VAN BOCXLAER, J. A bio-analytical hydrophilic interaction LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of omeprazole and lansoprazole in human plasma in support of a pharmacokinetic omeprazole study in children. **Journal of Separation Science**, 2010.

DEETLEFS, M.; HARDACRE, C.; NIEUWENHUYZEN, M.; SHEPPARD, O.; SOPER, A. K. Structure of ionic liquid-benzene mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 4, p. 1593–1598, 2005.

ESCUDERO, L. B.; CASTRO GRIJALBA, A.; MARTINIS, E. M.; WUILLOUD, R. G. Bioanalytical separation and preconcentration using ionic liquids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7597–7613, 2013.

ESPINOSA BOSCH, M.; RUIZ SÁNCHEZ, A. J.; SÁNCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C. Review of analytical methodologies for the determination of 5-HT<inf>3</inf> receptor antagonists. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 341–350, 2017.

FAN, Y. C.; HU, Z. L.; CHEN, M. L.; TU, C. S.; ZHU, Y. Ionic liquid based dispersive liquidliquid microextraction of aromatic amines in water samples. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 8, p. 985–987, 2008.

FAN, Y.; LIU, S.; XIE, Q. Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 119, p. 291–298, 2014. Disponível em: .

FANG, H.; XU, J.; MEI, Q.; DIAO, L.; CHEN, M.; JIN, J.; XU, X. Involvement of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein in first-pass intestinal extraction of omeprazole in rabbits. **Acta Pharmacologica Sinica**, n. 11, p. 1566–1572, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2009.142>.

FARAJZADEH, M. A.; KHORRAM, P.; PAZHOHAN, A. Simultaneous determination of atorvastatin and valsartan in human plasma by solid-based disperser liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2016.

FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, C.; TERESA PENA, M.; 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, n. 1, p. 88–96, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.016>.

FERNANDEZ, P.; TABOADA, V.; REGENJO, M.; MORALES, L.; ALVAREZ, I.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A. Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 124, p. 189–197, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.041%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/

S0731708516301042>.

FONTÃO, H.; LOPES, E. D. M.; HERINGER, B. H. D. F.; NEVES, S. S.; LUIS, S.; SILVA, M. B.; SÃO, U. De; DEPARTAMENTO, P.; QUÍMICA, D. E.; ITAJUBÁ-LORENA, R. Tomada De Decisão Em Uma Pequena Empresa. p. 1–7, [s.d.]

FRERICHS, V. A.; ZARANEK, C.; HAAS, C. E. Analysis of omeprazole, midazolam and hydroxy-metabolites in plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 824, n. 1–2, p. 71–80, 2005.

GAL, O.; VIDEAU, O.; DELAFORGE, M.; LEVI, M.; THE, E.; BECQUEMONT, L.; BEAUNE, P.; BE, H. Biochemical and analytical development of the CIME cocktail for drug fate assessment in humans. p. 2407–2419, 2010.

GESQUIERE, I.; HENS, B.; VAN DER SCHUEREN, B.; MOLS, R.; DE HOON, J.; LANNOO, M.; MATTHYS, C.; FOULON, V.; AUGUSTIJNS, P. Drug disposition before and after gastric bypass: fenofibrate and posaconazole. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, p. 1325–1332, 2016.

GHASSABIAN, S.; CHETTY, M.; TATTAM, B. N.; CHEM, C.; GLEN, J.; RAHME, J.; STANKOVIC, Z.; RAMZAN, I.; MURRAY, M.; MCLACHLAN, A. J. O RIGINAL A RTICLE A High-Throughput Assay Using Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous In Vivo Phenotyping of 5 Major Cytochrome P450 Enzymes in Patients. v. 31, n. 2, p. 239–246, 2009.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MAGGIO, R. M.; CERRETANI, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 913, p. 1–21, 2016.

GONG, A.; ZHU, X. Dispersive solvent-free ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquidliquid microextraction coupled with HPLC for determination of ulipristal acetate. **Talanta**, v. 131, p. 603–608, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.021>.

GONG, A.; ZHU, X. Miniaturized ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in a coupled-syringe system combined with UV for extraction and determination of danazol in danazol capsule and mice serum. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 159, p. 163–168, 2016. Disponível em: .

HAN, D.; ROW, K. H. Recent applications of ionic liquids in separation technology. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2405–2426, 2010.

HASHEMI, B.; SHAMSIPUR, M.; BARATI, A. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop with central composite design for the determination of nitrophenols using high-performance liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2046–2053, 2015.

HATAMI, M.; KARIMNIA, E.; FARHADI, K. Determination of salmeterol in dried blood spot using an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 283–287, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.025>. HAYAMA, T.; YABUUCHI, Y.; IWAMATSU, T.; TAMASHIMA, E.; KAWAMI, Y.; ITOYAMA, M.; YOSHIDA, H.; YAMAGUCHI, M.; NOHTA, H. Concerted derivatization and concentration method with dispersive liquid-liquid microextraction for liquid chromatographic analysis of 5-hydroxyindoles in human serum. **Talanta**, v. 117, p. 27–31, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.035>.

HERIF, Z. A. E. L.; OHAMED, O. M.; ARDICY, G. E. L. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Lansoprazole , Omeprazole and Pantoprazole Sodium Sesquihydrate in Presence of Their Acid-Induced Degradation Products. v. 54, n. 6, p. 814–818, 2006.

HO, T. D.; ZHANG, C.; HANTAO, L. W.; ANDERSON, J. L. Ionic liquids in analytical chemistry: Fundamentals, advances, and perspectives. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 262–285, 2014.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **The Analyst**, v. 127, n. 5, p. 608–613, 2002.

HOFMANN, U.; SCHWAB, M.; TREIBER, G.; KLOTZ, U. Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 831, n. 1–2, p. 85–90, 2006.

HUDDLESTON, J. G.; VISSER, A. E.; REICHERT, W. M.; WILLAUER, H. D.; BROKER, G. A.; ROGERS, R. D.; APRIL, R. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation Green Context. 2001.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JIA, H.; LI, W.; ZHAO, K. Determination of omeprazole in rat plasma by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 837, n. 1–2, p. 112–115, 2006.

KALATE BOJDI, M.; BEHBAHANI, M.; MASHHADIZADEH, M. H.; BAGHERI, A.; HOSSEINY DAVARANI, S. S.; FARAHANI, A. Mercapto-ordered carbohydrate-derived porous carbon electrode as a novel electrochemical sensor for simple and sensitive ultra-trace detection of omeprazole in biological samples. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 213–219, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.006>.

KANAZAWA, H.; OKADA, A.; MATSUSHIMA, Y.; YOKOTA, H. Determination of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography – mass spectrometry. v. 949, p. 1–9, 2002.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 113–119, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.011>.

LANÇAS, F. M. Vantagens e limitações da miniaturização em cromatografia líquida.

Scientia Chromatographica, v. 1, n. Lc, p. 51–60, 2009.

LENARDÃO, E. J.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, C. F. Divulgação. v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LEONG, M.-I.; FUH, M.-R.; HUANG, S.-D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. Journal of Chromatography A, v. 1335, p. 2–14, 2014. Disponível em: .

LÉVÊQUE, J. M.; ESTAGER, J.; DRAYE, M.; CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; BONRATH, W. Synthesis of ionic liquids using non conventional activation methods: An overview. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 11, p. 1103–1113, 2007.

LI, Z.; CHEN, F.; WANG, X.; WANG, C. Ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 2, p. 254–258, 2013.

LIN, W.; ZHANG, J.; LING, X.; YU, N.; LI, J.; YANG, H.; LI, R.; CUI, J. Evaluation of the effect of TM208 on the activity of five cytochrome P450 enzymes using on-line solid-phase extraction HPLC – DAD : A cocktail approach. **Journal of Chromatography B**, v. 923–924, p. 29–36, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.031>.

LIU, J. F.; JIANG, G. Bin; JÖNSSON, J. Å. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 20–27, 2005.

LIU, J.; JIANG, G.; CHI, Y.; CAI, Y.; ZHOU, Q.; HU, J.-T. Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 21, p. 5870–5876, 2003.

LIU, L.; HE, L.; JIANG, X.; ZHAO, W.; XIANG, G.; ANDERSON, J. L. Macrocyclic polyaminefunctionalized silica as a solid-phase extraction material coupled with ionic liquid dispersive liquidliquid extraction for the enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 8, p. 1004–1011, 2014.

LIU, Y.; ZHAO, E.; ZHU, W.; GAO, H.; ZHOU, Z. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. Journal of Chromatography A, v. 1216, n. 6, p. 885–891, 2009.

M. MONZÓN, C.; TEGLIA, C.; R. DELFINO, M.; GOICOECHEA, H. Chemometric optimization and validation of a novel dispersive liquid–liquid microextraction–HPLC method for gliclazide, glibenclamide and glimepiride quantitation in serum samples. [s.l: s.n.]v. 127

MA, J.; WANG, S.; ZHANG, M.; ZHANG, Q.; ZHOU, Y.; LIN, C.; LIN, G.; WANG, X. Simultaneous determination of bupropion, metroprolol, midazolam, phenacetin, omeprazole and tolbutamide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to cytochrome P450 activity study in rats. **Biomedical Chromatography**, 2015.

MACEK, J.; KLÍMA, J.; PTÁČEK, P. Rapid determination of omeprazole in human plasma by protein precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, n. 1–2, p. 282–287, 2007.
MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. Fluid Phase Equilibria, v. 219, n. 1, p. 93–98, 2004.

MARTENS-LOBENHOFFER, J.; REICHE, I.; TR, U.; KLAUS, M.; MALFERTHEINER, P.; BODE-B, S. M. Enantioselective quantification of omeprazole and its main metabolites in human serum by chiral HPLC – atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. v. 857, p. 301–307, 2007.

MARTINS, F.; SÉRGIO, P.; LACERDA, B. De; JUNIOR, J. Divulgação. v. 28, n. 1, p. 103– 110, 2005.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.

MITROV-WINKELMOLEN, L.; VAN BUUL-GAST, M. C. W.; SWANK, D. J.; OVERDIEK, H. W. P. M.; VAN SCHAIK, R. H. N.; TOUW, D. J. The Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in Morbidly Obese Patients on Pharmacokinetics of (Acetyl)Salicylic Acid and Omeprazole: the ERY-PAO Study. **Obesity Surgery**, 2016.

NAGESWARA RAO, R.; MASTAN VALI, R.; VARA PRASADA RAO, A. Determination of rifaximin in rat serum by ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with RP-HPLC. Journal of Separation Science, v. 35, n. 15, p. 1945–1952, 2012.

NARDOTTO, G. H. B.; COELHO, E. B.; MARQUES, M. P.; LANCHOTE, V. L. Chiral analysis of carvedilol and its metabolites hydroxyphenyl carvedilol and O-desmethyl carvedilol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 1015–1016, p. 173–180, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.028>.

NAZIR, S.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; NASIR, F. Pharmacokinetics of omeprazole and its metabolites in three phases of menstrual cycle. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 40, n. 1, p. 13–22, 2015.

NEVADO, J. J. B.; PENALVO, G. C.; DORADO, R. M. R.; ROBLEDO, V. R. Simultaneous Determination of Omeprazole and Their Main Metabolites in Human Urine Samples by Capillary Electrophoresis Using Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Detection. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 92, p. 211–219, abr. 2014.

NOUBARANI, M.; KEYHANFAR, F.; MOTEVALIAN, M.; MAHMOUDIAN, M. Improved HPLC method for determination of four PPis, omeprazole, pantoprazole, lansoprazole and rabeprazole in human plasma. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2010.

OH, K. S.; PARK, S. J.; SHINDE, D. D.; SHIN, J. G.; KIM, D. H. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B:** Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 895–896, p. 56–64, 2012.

OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L. Ionic liquids : perspectives for organic and catalytic reactions. v. 183, n. October 2001, p. 419–437, 2002.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 290–307, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.014>.

PADRÓ, J. M.; MARSÓN, M. E.; MASTRANTONIO, G. E.; ALTCHEH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; RETA, M. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. **Talanta**, v. 107, p. 95–102, 2013.

PANAGIOTOU, A. N.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Application of chemometric assisted dispersive liquid-liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 2, p. 135–140, 2009.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo Da Solubilidade Das Proteínas Presentes No Soro De Leite E Na Clara De Ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 1, p. 57–65, 2003.

PEPPER, M. S. Quantitative plasma analysis using automated online solid-phase extraction with column switching LC-MS / MS for characterising cytochrome P450 2D6 and 2C19 metabolism. p. 1102–1110, 2011.

PETRIDIS, N. P.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Chemometric optimization of dispersive suspended microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 46–52, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.019>.

PURIS, E.; PASANEN, M.; GYNTHER, M.; HÄKKINEN, M. R. RESEARCH PAPER A liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of nine cytochrome P450 probe drugs and their corresponding metabolites in human serum and urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9994-x.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 18, p. 4501–4512, 2014.

RAMISETTI, N. R.; NIMMU, N. V.; CHALLA, G. N. Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by RP-HPLC determination of saquinavir in rat serum: Application to pharmacokinetics. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 12, p. 1874–1880, 2014.

RAO, R. N.; RAJU, S. S.; VALI, R. M. Ionic-liquid based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of antihypertensives in rat serum. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 931, p. 174–180, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.027>. 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. **Journal of chromatography. A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306005280>.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; HOJJATI, M.; FARAJI, M. Novel extraction method based on the dispersion of the extraction solvent for extraction of letrozole from biological fluids. **Analytical Methods**, v. 2, n. 9, p. 1341–1345, 2010. Disponível em: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-

77958105536&partnerID=40&md5=47f87a849e52f781e08d09a035f4a938>.

REZK, N. L.; BROWN, K. C.; KASHUBA, A. D. M. A simple and sensitive bioanalytical assay for simultaneous determination of omeprazole and its three major metabolites in human blood plasma using RP-HPLC after a simple liquid-liquid extraction procedure. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 844, n. 2, p. 314–321, 2006.

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, G. D.; DA SILVA, L. H. M.; DO CARMO HESPANHOL DA SILVA, M. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determina????o de poluentes fen??licos em ??gua. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, p. 1370–1378, 2010.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques. [s.l: s.n.]v. 406

SATO, B. M. Síntese e Propriedades de Léquidos Iônicos e Tensoativos. 2011.

SHARMA, V. D.; AKOCAK, S.; ILIES, M. A.; FASSIHI, R. Solid-State Interactions at the Core-Coat Interface : Physicochemical Characterization of Enteric-Coated Omeprazole Pellets Without a Protective. n. 7, 2015.

SHIMIZU, M.; UNO, T.; NIIOKA, T.; YAUI-FURUKORI, N.; TAKAHATA, T.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 832, n. 2, p. 241–248, 2006a.

SHIMIZU, M.; UNO, T.; NIIOKA, T.; YAUI-FURUKORI, N.; TAKAHATA, T.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2006b.

SHIOHIRA, H.; YASUI-FURUKORI, N.; TATEISHI, T.; UNO, T. Chiral assay of omeprazole and metabolites and its application to a pharmacokinetics related to CYP2C19 genotypes. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 24, p. 2465–2470, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.046>.

SONG, Q.; NAIDONG, W. Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) - Eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 830, n. 1, p. 135–142, 2006.

SUH, J. H.; LEE, Y. Y.; LEE, H. J.; KANG, M.; HUR, Y.; LEE, S. N.; YANG, D. H.; HAN, S. B. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 214–219, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.041.

SUN, J.-N.; SHI, Y.-P.; CHEN, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of trace celastrol in urine. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 879, n. 30, p. 3429–3433, 2011. Disponível em: .

TALEBIANPOOR, M. S.; KHODADOUST, S.; ROZBEHI, A.; AKBARTABAR TOORI, M.; ZOLADL, M.; GHAEDI, M.; MOHAMMADI, R.; HOSSEINZADEH, A. S. Application of optimized dispersive liquid-liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2014.

TANAKA, S.; UCHIDA, S.; INUI, N.; TAKEUCHI, K.; WATANABE, H. Simultaneous LC-MS / MS Analysis of the Plasma Concentrations of a Cocktail of 5 Cytochrome P450 Substrate Drugs and Their Metabolites. v. 37, n. 1, p. 18–25, 2014.

TEÓFILO, R. F. Chemometric methods in the electrochemical studies of phenols on borondoped diamond films. p. 118, 2007.

TIAN, J.; CHEN, X.; BAI, X. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction based on organic solvent and ionic liquid combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of emodin and its metabolites in urine samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 1, p. 145–152, 2012.

VITTAL, S.; GANNEBOINA, R.; LAYEK, B.; TRIVEDI, R. K.; HOTHA, K. K.; BHARATHI, D. V.; MULLANGI, R. Highly sensitive method for the determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 23, n. 4, p. 390–6, 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937302>.

WOJNICZ, A.; GIL GARCÍA, A. I.; ROMÁN-MARTÍNEZ, M.; OCHOA-MAZARRO, D.; ABAD-SANTOS, F.; RUIZ-NUÑO, A. Improvement and validation of a high-performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry method for monitoring of omeprazole in Plasma. [s.l: s.n.]v. 37

WOOLF, E. J.; MATUSZEWSKI, B. K. Simultaneous determination of omeprazole and 59 -

hydroxyomeprazole in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. v. 828, p. 229–238, 1998.

XIAO-HUAN, Z.; QIU-HUA, W. U.; MEI-YUE, Z.; GUO-HONG, X. I.; ZHI, W. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1.

XIAO, C.; TANG, M.; LI, J.; YIN, C. ru; XIANG, G.; XU, L. Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 111–116, 2013.

XU, X.; SU, R.; ZHAO, X.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LI, D.; LI, X.; ZHANG, H.; WANG, Z. Ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of sulfonamides in river water, honey, milk, and animal plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 707, n. 1–2, p. 92–99, 2011.

YAN, Y.; CHEN, X.; HU, S.; BAI, X. Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 1–17, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.068>.

ZEEB, M.; FARAHANI, H.; PAPAN, M. K. Determination of atenolol in human plasma using ionic-liquid-based ultrasound-assisted in situ solvent formation microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 11, p. 2138–2145, 2016. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201501365>.

ZHANG, P.; HU, L.; LU, R.; ZHOU, W.; GAO, H. Application of ionic liquids for liquid–liquid microextraction. **Analytical Methods**, v. 5, n. 20, p. 5376, 2013. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay40597d>.

ZHAO, H.; XIA, S.; MA, P. Use of ionic liquids as "green" solvents for extractions. **Journal** of Chemical Technology and Biotechnology, v. 80, n. 10, p. 1089–1096, 2005.

ZHAO, P.; DENG, M.; HUANG, P.; YU, J.; GUO, X.; ZHAO, L. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous enantioselective determination of representative proton-pump inhibitors in water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2016.

ZHAO, R. S.; WANG, X.; LI, F. W.; WANG, S. S.; ZHANG, L. L.; CHENG, C. G. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 7, p. 830–836, 2011.

ZULOAGA, O.; OLIVARES, M.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; PRIETO, A. Dispersive liquid – liquid microextraction : trends in the analysis of biological samples. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2211–2225, 2015.

"Observe: quem pensá pouco errá muito." Leonárdo da Vinci

ANEXOS



RESPITAL DAS CUNICAS DA PACULDADE DE MEDICINA DE MIERINÃO PRETO DA UNEVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 03 de agosto de 2010

Oficio nº 2510/2010 CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "INFLUÊNCIA DA CIRURGIA BARIÁTRICA NA ABSORÇÃO DE MEDICAMENTOS: HIDROCLORTIAZIDA, CAPTOPRIL, PROPRANOLOL, OMEPRAZOL E SINVASTATINA" foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: <u>APROVADO</u>, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP n° 6695/2010.

Este Comité segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. Atenciosamente.

Sagerad Manove

DR" MARCIA GUIMARÁES VILLANOVA Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustrissimos Senhores PROF. DR. WILSON SALGADO JUNIOR CAMILA SCALASSARA CAMPOS (Aluna) Depto. de Cirurgia e Anatomia

Depts, de Cirsi-pla a Mantreala Junolea 10 08. 2010 10,00

Comité de Ética em Peequisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2185 e Registra SISNEPICONEP nº 4 Fonc (10) 3692-2228 - E-mail : expétitory unp.ter Monte Alegre 14045-500 Ribeisão Preto SP



Declaração

Eu, Prof. Dr. Wilson Salgado Júnior portador do CPF: 181.163.648-98 do Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), responsável pelo projeto "Influência da cirurgia bariátrica na absorção de medicamentos: hidroclortiazida, captopril, propranolol, omeprazol e sinvastatina" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em 03 de agosto de 2010 de acordo com o processo HCRP nº 6695/2010. Declaro que o projeto "Desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico para determinação de omeprazol em plasma humano por cromatografia liquida de alta eficiência" desenvolvido pela pós-graduanda Larissa Alves dos Reis Dias portadora do CPF: 361.349.238-50, sob orientação da Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitane portadora do CPF: 139.510.698-30 ambas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP está vinculado ao projeto supracitado, o qual sou responsável. Declaro também que solicitei ao CEP do HCRP a inclusão da aluna como pesquisadora com aprovação pelo CEP - HCRP na reunião realizada em 23 de marco de 2015 para que ela possa desenvolver o subprojeto em minha parceria.

Wilson gado Júnior

Coordenador do Setor de Cirurgia Bariátrica



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 25 de março de 2015.

Oficio nº 1132/2015 CEP/MGV

PROCESSO HCRP Nº. 6695/2010

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 404ª Reunião Ordinária, realizada em 23/03/2015, tomou ciência da inclusão das pesquisadoras Larissa Alves dos Reis Dias e Renata Viesti Advincula Collares Pelizaro, bem como do relatório de andamento da pesquisa, conforme carta datada de 11 de março de 2015, referentes à pesquisa: "INFLUÊNCIA DA CIRURGIA BARIÁTRICA NA ABSORÇÃO DE MEDICAMENTOS: HIDROCLORTIAZIDA, CAPTOPRIL, PROPANOLOL, OMEPRAZOL E SINVASTATINA".

Atenciosamente,

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustrissimo Senhor **PROF. DR. WILSON SALGADO JUNIOR CAMILA SCALASSARA CAMPOS (Aluna)** Departamento de Cirurgia e Anatomia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus Universitário - Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP Five-00002735: IRB-00002186 e

FIVA-00002733; IRB-00002186 e Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440 (016) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2016.

Oficio nº 425/2016 CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 6695/2010

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 420" Reunião Ordinária, realizada em 01/02/2016, <u>analisou e aprovou</u> a emenda, bem como o Projeto de Pesquisa versão 5 e a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo **"INFLUÊNCIA DA CIRURGIA BARIÁTRICA NA ABSORÇÃO DE MEDICAMENTOS: HIDROCLORTIAZIDA, CAPTOPRIL, PROPRANOLOL, OMEPRAZOL E SINVASTATINA".**

Atenciosamente.

201

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustrissimo Senhor **PROF. DR. WILSON SALGADO JÚNIOR** Depto. de Cirurgia e Anatomia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus Universitário - Monte Alegre 14046-900 Ribeirão Preto SP FWA-00002733, IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440 (16) 3602-2228

cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br



DECLARAÇÃO

Conforme solicitação realizada pela Prof . Dr. Wilson Salgado Junior e pela aluna de doutorado Larissa Alves do Reis Dias declaramos que o HEMAC - Serviço de Hemoterapia, reconhecendo a importância desempenhada pelas pesquisas no entendimento das patologias, seu diagnóstico e tratamento, está de acordo em ceder quatro unidades de Plasma Fresco Congelado de seus estoques para a realização do projeto de pesquisa intitulado "Influencia da cirurgia bariátrica na absorção de medicamentos: hidroclorotiazida, captopril, propranolol, omeprazol e sinvastatina", desde que sejam cumpridas as determinações da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a pesquisa com seres humanos e que o referido projeto de pesquisa seja previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Todas as unidades cedidas foram testadas e apresentam todas as provas sorológicas negativas, estando liberadas para utilização conforme RDC vigente. Além disso, todas as bolsas contam com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos seus respectivos doadores. Esclarecemos que se tratam de unidades de plasma excedentes do uso clínico e, portanto, não haverá prejuízo aos estoques do Hospital São Francisco e ao atendimento hemoterápico dos pacientes assistidos por esta instituição.

Está doação se realiza **EXCLUSIVAMENTE** para fins acadêmicos, ficando expressamente proibido o uso total ou parcial deste material em seres humanos ou a sua comercialização. Além disso, fica acordado que o transporte, acondicionamento, o armazenamento e correto manuseio deste material é de responsabilidade **EXCLUSIVA** da beneficiada.

Finalmente, é de pleno conhecimento de ambas as partes que, por questões de limitações metodológicas, não é possível excluir a janela imunológica para as doenças testadas. Fica acordado que no caso de NOTIFICAÇÃO da Vigilância Sanitária devido a SOROCONVERSÃO a ENTIDADE RECEPTORA será comunicada.

Atenciosamente.

Ribeirão Preto, 20 de Julho de 2015.

Dr. Geraldo Santana da Cunha Júnior Coordenador Médico do Hemac – Serviço de Hemoterapia