UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise deoxibutinina e de N-desetiloxibutininaem urina por eletroforese capilar

Bruna Juliana Moreira

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise deoxibutinina e de N-desetiloxibutininaem urina por eletroforese capilar

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Bruna Juliana Moreira

Orientador(a): Cristiane Masetto de Gaitani

Ribeirão Preto
2012

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

Moreira, Bruna Juliana

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise de oxibutinina e de N-desetiloxibutinina em urina por eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2012.

79 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Gaitani, Cristiane de Masetto.

1. Eletroforese capilar. 2. Microextração líquido-líquido dispersiva. 3. Oxibutinina. 4. N-desetiloxibutinina. 5. Urina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Juliana Moreira
Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise de oxibutinina e de N-desetiloxibutinina em urina por eletroforese capilar.

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Cristiane de MasettoGaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas que compartilham
e compartilharam comigo,
todos os momentos de minha vida.
A meus pais Antonio e Solange,
a meu irmão Murilo,
a meus avôs Paulo e Benedito (in memoriam),
a minhas avós (Orlanda e Vitorina)
e a meu namorado Samuel.

AGRADECIMENTOS

A Deus,
por ter me concedido saúde e serenidade para concluir este trabalho.

A meus pais, Solange e Antonio,
que tanto amo, pelo incentivo e apoio.

Às minhas avós,Orlanda e Vitorina,
pela torcida e cuidado.

A meu namorado, Samuel,
pelo companheirismo e dedicação.

A minha orientadora Cristiane,
pela orientação, compreensão e amizade.

A Profª Pierina,
pela disponibilização dos recursos técnicos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Anderson e ao Keyller,
pelas inúmeras contribuições.

A Simone,
por apoiar meu crescimento profissional.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação e aos técnicos dos laboratórios,
pelo auxílio prestado.

Aos amigos do laboratório,
por compartilhar conhecimentos e momentos de descontração.

As amigas de longa data, Silvia, Gabriela e Ana Carla,
pela convivência e bons momentos.

Aos amigos de graduação, que se fizeram presentes durante o mestrado,
(Thamiris, Fabrício, Noemi, Willian, Ivana, Josimar, Thaís)
pelos momentos de distração.

A todos que,
nas mais diversas circunstâncias, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MOREIRA, B. J. **Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise de oxibutinina e de N-desetiloxibutinina em urina por eletroforese capilar.**2012. 79f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma técnica de preparo de amostra baseada no equilíbrio de distribuição do analito entre a fase doadora (amostra) e a fase aceptora (solvente orgânico) em um sistema ternário de solventes. Foi desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água e por ser uma técnica muito recente,ainda é pouca explorada para o preparo de amostras biológicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a DLLME como técnica para a extração da oxibutinina (OXY), fármaco usado para o tratamento da incontinência urinária, e da N-desetiloxibutinina (DEO), seu principal metabólito ativo, em amostras de urina. A análise da OXY e DEO foi realizada por eletroforese capilar (CE), utilizando um capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno, com comprimento efetivo de 36,5 cm, trietilamina 50 mmol/L, pH 3 como solução de eletrólito, tensão de30 kV, temperatura de 30°C e detecção em 204 nm. Nestas condições o tempo de migração da DEO foi de 7,12 min e da OXY foi de 7,42 min, com resolução de 3,1. O procedimento utilizado para preparo da amostra foi baseado na DLLME, utilizando 5 mL de urina,na qual foi adicionado 2,5% de NaCle cujo pH foi ajustado para 11. O solvente para a extração consistiu de uma mistura de 140 µL de tetracloreto de carbono (solvente extrator) e 260 µL de acetonitrila (solvente dispersor), que permaneceram em contato com a amostra pordois minutos. A avaliação das características de desempenho analítico apresentou faixa linear de 90-300 ng/mL para a OXY e 187,5-750ng/mL para a DEO. A recuperação absoluta foi de 71,4 e 60,9% e o limite de quantificação foi de 90 e 187,5 ng/mL para a OXY e DEO, respectivamente. Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erros relativos inferiores a 15% e as amostras foram estáveis nos estudos de estabilidade. Portanto, foi possível desenvolver um método rápido, fácil e confiável para analisar e quantificar a OXY e a DEO em amostras de urina por CE, usando a DLLME como técnica de preparo de amostra.

Palavras-chave: eletroforese capilar, microextração líquido-líquido dispersiva, oxibutinina, N-desetiloxibutinina, urina.

ABSTRACT

MOREIRA, B. J. **Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for oxybutynin and N-desethyloxybutynin urine analysis by capillary electrophoresis.** 2012. 79f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2012.

The dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a sample preparation technique based on the equilibrium distribution between an extraction solvent and a sample solution in a ternary solvent system. It was developed by Rezaee and co-workers in 2006 for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. Until now, for being a very recent technique it was little explored for the analysis of drugs in biological fluids. Therefore, the aim of this work was to evaluate the DLLME as an extraction technique for oxybutynin (OXY), a drug used to treat urinary incontinence, and N-desethyloxybutynin (DEO), its main active metabolite in urine samples. The OXY and DEO's analysis was performed by capillary electrophoresis (CE) using a 50 µm ID fused-silica capillary with an effective length of 36.5 cm with a photodiode array detector set at 204 nm. It made use of triethylamine 50 mmol/L pH 3 as background electrolyte, voltage of +30 kV and temperature of 30°C. Under these conditions the migration time were 7.12 minutes for DEO and 7.42 minutes for OXY, with a resolution of 3.1. The sample preparation procedure was based on DLLME and used 5 mL of urine samples whichionic strength was increased by the addition of 2.5% NaCland pH were adjusted to 11. The extraction mixture consisted of 140 µL of carbon tetrachloride (extraction solvent) and 260 µL of acetonitrile (disperser solvent), which remained in contact with the sample for two minutes. The analytical performance's evaluation presented linear range of 90-300 ng/mL for OXY and 187.5-750ng/mL for DEO. The absolute recovery were 71.4 and 60.9% and the limit of quantification were 90.0 and 187.5 ng/mL for OXY and DEO, respectively. The accuracy and precision studies showed coefficients of variation and errors below 15% and the samples were stable at stability studies. Therefore, it was possible to develop a fast, reliable and easy method to analyze and quantify OXY and DEO in urine samples by CE, using DLLME as a sample preparation technique.

Keywords: capillary electrophoresis, dispersive liquid-liquid microextraction, oxybutynin, N-desethyloxybutynin, urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do equipamento de eletroforese capilar 3

Figura 2 - Comparação entre as técnicas de HPLC e de eletromigração, como, por exemplo a CE. Em A: diferença entre os perfis dos fluxos e em B: comparação entre as eficiências 6

Figura 3 - Esquema representandoa origem do fluxo eletrosmótico 7

Figura 4 - Representação da migração dos analitos em FSCE 8

Figura 5 - Estrutura química da acetilcolina e dos antagonistas muscarínicos utilizados para o tratamento da síndrome da bexiga hiperativa 9

Figura 6 - Estrutura química da oxibutinina (OXY) e da N-desetiloxibutinina (DEO) 10

Figura 7 - Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva 16

Figura 8 - Publicações da DLLME encontradas desde a criação da técnica por busca realizada na plataforma de pesquisa Web ofKnowledge 17

Figura 9 - Publicações da DLLME envolvendo CE e amostra biológica (urina) encontradas por busca realizada na plataforma de pesquisa Web ofKnowledge 18

Figura 10 - Diagrama das etapas da DLLME 26

Figura 11 - Eletroferograma referente à análise da OXY e DEO em diferentes concentrações de TEA pH 3. Condições eletroforéticas: capilar de 45 cm de comprimento total e 50 µm de diâmetro interno; temperatura: 25ºC; tensão: +30 kV; injeção: 50 mbar por 20 segundos; detecção: 204 nm 38

Figura 12 - Eletroferogramas referentes à análise da OXY e DEO em diferentes temperaturas. Condições eletroforéticas: capilar de 45 cm de comprimento total e 50 µm de diâmetro interno; solução de eletrólito: TEA 50 mM, pH 3,0; tensão: +30 kV; injeção: 50 mbar por 20 segundos; detecção: 204 nm 40

Figura 13 - Eletroferograma referente à análise da OXY, da DEO e do IS. Condições eletroforéticas descritas na Tabela 10 43

Figura 14 - Solvente extrator para a extração da OXY e da DEO por DLLME 45

Figura 15 - Solvente dispersor para a extração da OXY e da DEO por DLLME 46

Figura 16 - Efeito do volume de solvente extrator para a extração da OXY e da DEO por DLLME 47

Figura 17 - Efeito do volume de solvente extrator no volume de fase sedimentada 47

Figura 18 - Efeito do volume de solvente dispersor para a extração da OXY e da DEO por DLLME 48

Figura 19 - Influência do tempo na extraçãoda OXY e da DEO por DLLME..... 49

Figura 20 - Influência do pH da amostra na extração da OXY e da DEO por DLLME 50

Figura 21 - Influência da força iônica na extração da OXY e da DEO por DLLME..... 51

Figura 22 - Eletroferograma de amostras de urina após procedimento de extração por DLLME. Em A, urina sem adição dos analitos e em B urina fortificada com os padrões de OXY, DEO e IS 53

Figura 23 - Gráfico de resíduos para OXY..... 55

Figura 24 - Gráfico de resíduos para DEO 56

Figura 25 - Avaliação da robustez do método, representada pelo gráfico de Pareto, no qual A = temperatura da análise, B = concentração do BGE e C = pH do BGE 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações plasmáticas obtidas no estado de equilíbrio antes de nova dose de administração oral de liberação imediata 11

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da OXY e da DEO 12

Tabela 3 - Métodos descritos na literatura para separação e quantificação da OXY e da DEO em matrizes biológicas 13

Tabela 4 - Métodos descritos na literatura para separação e quantificação da OXY e da DEO em formulações farmacêuticas 14

Tabela 5 - Condições avaliadas durante a otimização do método para análise da OXY e da DEO por CE 24

Tabela 6 - Condições avaliadas durante a otimização do método para análise da OXY e da DEO por CE utilizando TEA pH 3 como BGE 24

Tabela 7 - Concentrações de OXY e DEO na urina usadas para determinação da precisão e exatidão 30

Tabela 8 - Experimentos realizados para determinação da robustez do método 32

Tabela 9 - Análise da influência da eletrólise do BGE nos parâmetros eletroforéticos 41

Tabela 10 - Condições otimizadas para análise da OXY e da DEO por CE 43

Tabela 11 - Condições estabelecidas para a realização da extração da OXY e da DEO por DLLME 51

Tabela 12 - Linearidade e teste do modelo linear para a OXY e a DEO 55

Tabela 13 - Limite de quantificação do método para a análise da OXY e da DEO em urina... 57

Tabela 14 - Precisão intradia e interdias do método para a análise da OXY e da DEO em urina 57

Tabela 15 - Exatidão intradia e interdias do método para a análise da OXY e da DEO em urina 58

Tabela 16 - Recuperação do método para a OXY, a DEO e o IS em urina 59

Tabela 17 - Estabilidade da OXY e da DEO em urina após ciclos de congelamento e descongelamento 61

Tabela 18 - Estabilidade de curta duração para OXY e DEO em amostras de urina 62

Tabela 19 - Estabilidade de longa duração para OXY e DEO em amostras de urina 63

Tabela 20 - Estabilidade da OXY e da DEO pós-processamento 63

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v

1. INTRODUÇÃO **2**
1.1. Eletroforese capilar 2
1.2. Princípio da técnica de separação 5
1.3. Síndrome da bexiga hiperativa - Incontinência urinária 8
1.4. Oxibutinina (OXY) e N-desetiloxibutinina (DEO) 9
1.5. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME – "dispersive liquid-liquid microextraction") 14

2. OBJETIVOS **20**

3. MATERIAL E MÉTODOS **22**
3.1. Análise da OXY e da DEO por CE 22
3.1.1. Equipamentos 22
3.1.2. Reagentes e solventes 22
3.1.3. Capilar 23
3.1.4. Soluções padrão 23
3.1.5.Otimização das condições de análise 23
3.1.6.Seleção do padrão interno 24
3.2.Desenvolvimento do método para análise da OXY e da DEO em urina por DLLME 25
3.2.1. Equipamentos 25
3.2.2. Reagentes e solventes 25
3.2.3. Amostra biológica 25
3.2.4. Procedimento de preparo da amostra por DLLME 25
3.2.4.1. Seleção do solvente extrator 27
3.2.4.2. Seleção do solvente dispersor 27
3.2.4.3. Influência do volume de solvente extrator 27
3.2.4.4. Influência do volume de solvente dispersor 27
3.2.4.5. Influência do tempo de extração 28
3.2.4.6. Influência do pH da amostra 28
3.2.4.7. Influência da força iônica 28
3.3. Validação do método 28
3.3.1. Conformidade do sistema 29
3.3.2. Seletividade 29
3.3.3. Linearidade 29
3.3.4. Limite de quantificação 30

3.3.5. Precisão 30
3.3.6. Exatidão 31
3.3.7. Recuperação 31
3.3.8. Robustez 32
3.3.9. Estudos de estabilidade do fármaco em fluidos biológicos 33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
4.1.Análise da OXY e da DEO por CE 36
4.1.1.Condicionamento do capilar 36
4.1.2.Composição e pH da solução de eletrólitos 36
4.1.3.Concentração da solução de eletrólitos 37
4.1.4.Tensão aplicada 39
4.1.5.Temperatura de análise 39
4.1.6.Seleção do padrão interno 40
4.1.7.Eletrólise do eletrólito de corrida 40
4.1.8.Condições de separação otimizadas 42
4.2.Desenvolvimento do método para análise da OXY e da DEO em urina por DLLME 43
4.2.1.Características da matriz 43
4.2.2.Seleção do solvente extrator 44
4.2.3. Seleção do solvente dispersor 45
4.2.4.Influência do volume de solvente extrator 46
4.2.5.Influência do volume de solvente dispersor 48
4.2.6.Influência do tempo de extração 48
4.2.7.Influência do pH da amostra 49
4.2.8. Influência da força iônica 50
4.2.9. Condições finais estabelecidas para a extração 51
4.3.Validação do método 52
4.3.1.Conformidade do sistema 52
4.3.2.Seletividade 52
4.3.3.Linearidade 53
4.3.4.Limite de quantificação 56
4.3.5. Precisão 57
4.3.6. Exatidão 58
4.3.7. Recuperação 58
4.3.8.Robustez 59
4.3.9.Estudos de estabilidade do fármaco em fluidos biológicos 61

5. CONCLUSÕES 65

REFERÊNCIAS 67

ANEXOS..... 79

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eletroforese capilar

Técnicas que empregam a eletromigração em capilares têm se tornados populares na área da química analítica, especialmente no campo da bioanálise (SILVA, et al., 2007). Entre elas podem ser citadas: a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC – "micellar electrokinetic chromatography"), a isotacoforese capilar (CITP – "capillary isotachophoresis"), a eletrocromatografia capilar (CEC - "capillary electrochromatography"), a eletroforese capilar em gel (CGE - "capillary gel electrophoresis"), a focalização isoelétrica capilar (CIEF - "capillary isoelectric focusing") e a eletroforese capilar (CE – "capillary electrophoresis") (NATISHAN, 2005; SILVA, et al., 2007).

Devido à sua versatilidade analítica estas técnicas são aplicadas com sucesso para a separação de pequenos íons, moléculas neutras, biomoléculas, compostos quirais e estudos de parâmetros físico-químicos (ASSUNÇÃO et al., 2008; ISSAQ, 2000; SILVA, et al., 2007). Também são empregadas como técnicas alternativas e complementares a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – "high performance liquid chromatography") em análises de rotina (MAYER, 2001; NATISHAN, 2005).

As técnicas de eletromigração apresentam alta resolução e eficiência de separação, parâmetros importantes para técnicas de separação, principalmente para a análise de fármacos em amostras biológicas (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010). Além disso, possuem outras vantagens como baixo custo operacional, uso de pequenas quantidades de amostra, rapidez das análises, assim como produção de quantidades mínimas de resíduos, geralmente aquosos (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; ISSAQ, 2000; JAGER; TAVARES, 2001; SKOOG et al., 2008). Estas técnicas podem ser combinadas a vários sistemas de detecção (ANASTOS; BARNETT; LEWIS, 2005; BOONE et al., 1999; WEINBERGER, 2000) como os fotodetectores (baseados na absorção na região do ultravioleta/visível ou na fluorescência), os espectrômetros de massas e os detectores amperométricos (SKOOG et al., 2008; TAVARES, 1996). As desvantagens destas técnicas são: menor robustez quando comparadas ao HPLC e baixa detectabilidade se a detecção for feita por ultravioleta em decorrência do pequeno caminho óptico fornecido pelo capilar e da pequena quantidade de amostra que pode ser injetada (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; BOONE et al., 1999; NATISHAN, 2005; QUIRINO; TERABE, 2000).

A CE também conhecida como eletroforese capilar em solução livre (FSCE, "free solution capillary electrophoresis") foi desenvolvida por Mikkers, Jorgenson e Tsuda por volta de 1980 (BOONE et al., 1999; ISSAQ, 2000) e é uma das técnicas de eletromigração mais empregadas na prática (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; BOONE et al., 1999; NATISHAN, 2005; TAVARES, 1997; ZHU; HU; LIU, 2006). Baseia-se na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis sob influência de um campo elétrico (BOONE et al., 1999; SKOOG, 2002).

Um esquema típico de um sistema de CE é mostrado na Figura 1. Os principais componentes são: uma fonte de alta tensão, eletrodos de platina, um capilar, um sistema de detecção conectado a um sistema de aquisição de dados, um sistema de introdução de amostra e dois reservatórios contendo solução de eletrólitos (BGE - "background electrolyte") (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005).

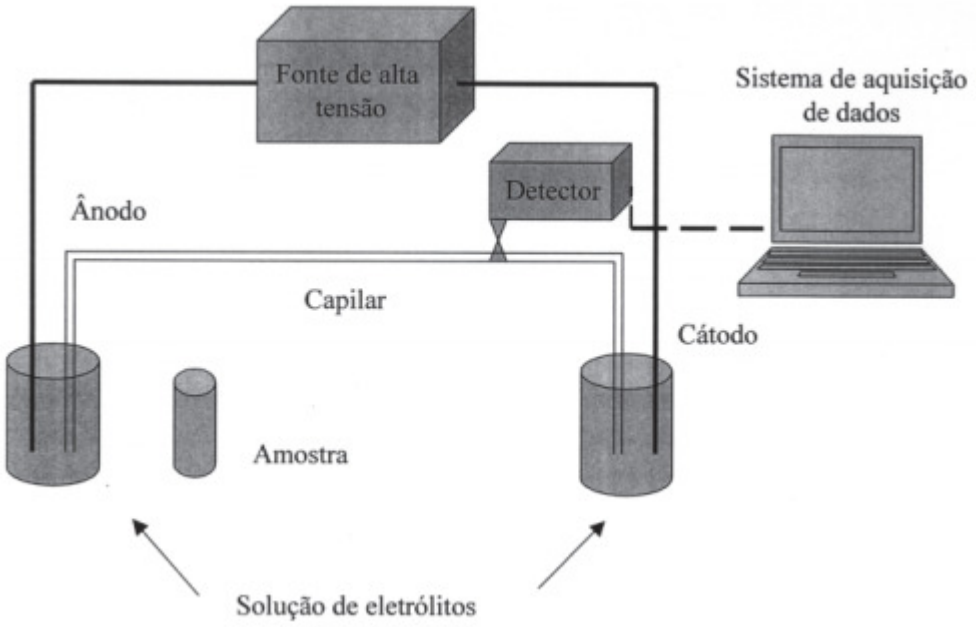


Figura 1 - Esquema do equipamento de eletroforese capilar (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005).

O capilar de CE é normalmente de sílica fundida (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007; TAVARES, 1996; WEINBERGER, 2000), material constituído de polímeros reticulados de dióxido de silício (WEINBERGER, 2000) e é revestido por uma fina camada de poliimida, que permite a flexibilidade do mesmo (RIGHETTI et al., 2004). As dimensões variam de 25-100 µm de diâmetro interno e 20-100 cm de comprimento total (BOONE et al., 1999; FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007), podendo o preenchimento ser realizado com

soluções cujas concentrações variam de 5-200 mmol/L e com intervalo de pH de 2 a 11 (TAVARES, 1997).

Para cada análise, o tubo capilar é preenchido com uma solução de BGE conveniente, geralmente uma solução tampão aquosa. A solução da amostra é injetada pela extremidade frontal do capilar, usualmente o ânodo, por substituição de um dos reservatórios da solução de BGE por outro que contém a amostra (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005). O volume injetado é da ordem de nanolitros (ASSUNÇÃO et al., 2008; BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005; FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007; SKOOG et al., 2008).

A injeção da amostra pode ser feita de três formas: injeção hidrodinâmica, por sifonagem e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é realizada aplicando-se pressão no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório contendo solução de BGE na outra extremidade do capilar. A injeção por sifonagem é feita por deslocamento de líquido devido a diferença de altura dos reservatórios de amostra e de BGE e a injeção eletrocinética é realizada pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos. O último tipo de injeção apresentado é discriminatório, já que a amostra injetada dependerá da relação carga/massa dos solutos presentes, e é menos preciso e robusto de que a injeção hidrodinâmica, na qual ocorre uma simples transferência de volume (MAYER, 2001; TAVARES, 1996). Para amostras biológicas como plasma e urina que variam em composição e condutividade, o modo de injeção hidrodinâmico é o mais indicado (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; MAYER, 2001).

Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar e os eletrodos conectados a fonte de alta tensão são imersos novamente nos dois reservatórios contendo solução de BGEs para completar o contato elétrico (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005; TAVARES, 1996). Um dos eletrodos é conectado a um cabo condutor da fonte enquanto o outro eletrodo é conectado a um fio terra, o que resulta na obtenção de um ânodo (+) e um cátodo (-), respectivamente (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005).

A aplicação de potencial elétrico através do capilar permite, então, a ocorrência de movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. A detecção dos compostos separados é realizada na extremidade terminal do capilar (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005; TAVARES, 1996).

1.2. Princípio da técnica de separação

Basicamente, a seletividade em CE é obtida pela diferença de mobilidade entre os analitos, que é dependente da carga (q) e do tamanho de cada analito (r = raio do íon) e da viscosidade do meio (η) (BOER et al., 1999). A mobilidade eletroforética (μE) é inerente à espécie iônica, logo, cátions migram em direção ao cátodo e os ânions migram em direção ao ânodo e quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior é a mobilidade (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005), que pode ser expressa pela Equação 1. Portanto, quando se separa uma mistura de íons de diferentes cargas e tamanhos, os menores e mais carregados serão detectados primeiro (ALTRIA, 1996; GRAEF, 2007).

Equação 1:

$$\mu_{\mathbf{E}} = \frac{q}{6\ \pi \eta r}$$

Outro fator que contribui para a separação, além da mobilidade eletroforética, é o fluxo eletrosmótico (EOF – "electroosmotic flow"). O EOF é uma das mais distintas propriedades das técnicas de eletromigração e caracteriza a maior vantagem destas técnicas em relação à técnica de HPLC (SILVA et al., 2007). Em cromatografia líquida, devido ao uso de bombas, o fluxo hidrodinâmico apresenta um perfil parabólico ou laminar, ocasionando um alargamento das bandas. Já em técnicas de eletromigração, o perfil do EOF é plano, resultando em uma velocidade uniforme dos analitos através do capilar, o que causa menor dispersão da amostra e, portanto, maior eficiência, como mostra a Figura 2 (HARRIS, 2008; KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993; SILVA et al., 2007).

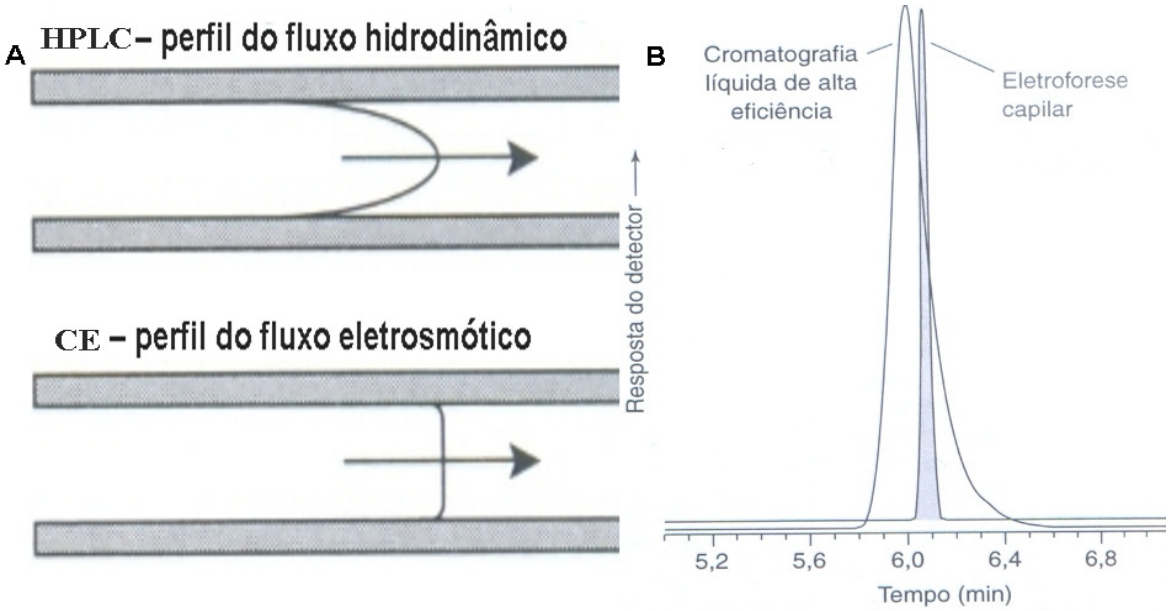


Figura 2 - Comparação entre as técnicas de HPLC e de eletromigração, como, por exemplo a CE. Em A: diferença entre os perfis dos fluxos e em B: comparação entre as eficiências(adaptado de HARRIS, 2008; HARVEY, 2000).

O EOF é proporcional ao potencial zeta (ς) e dependente da constituição química, viscosidade (η) e constante dielétrica (ε) da solução de BGE (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007), como pode ser observado pela Equação 2, da mobilidade eletrosmótica .

Equação 2:

$$\mu_{EO} = \frac{\varepsilon\varsigma}{4\pi\eta}$$

O potencial zeta é definido como o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento que é a distância na qual uma fração da camada difusa consegue escapar das forças de atração da superfície e é bastante elevado em meio básico, decrescendo rapidamente entre pH 8,0 e 4,0 e praticamente estabilizando em meio ácido (TAVARES, 1996).

Em valores de pH acima de quatro, ocorre a ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) da parede interna do capilar (TAVARES, 1996). Estes grupos silanóis dissociados (SiO^-) atraem cátions (contra íons) para a região imediatamente adjacente a sua superfície, formando a camada rígida ou fixa. A concentração de contra íons decresce com a distância e, eventualmente, aproxima-se do valor da concentração dos íons na solução formando a camada difusa (Figura 3). Quando um campo elétrico é disposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam na camada difusa, causando o movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Estes íons durante a migração arrastam o solvente com eles,

induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como EOF(HARRIS, 2008; SKOOG et al., 2008; TAVARES, 1996).

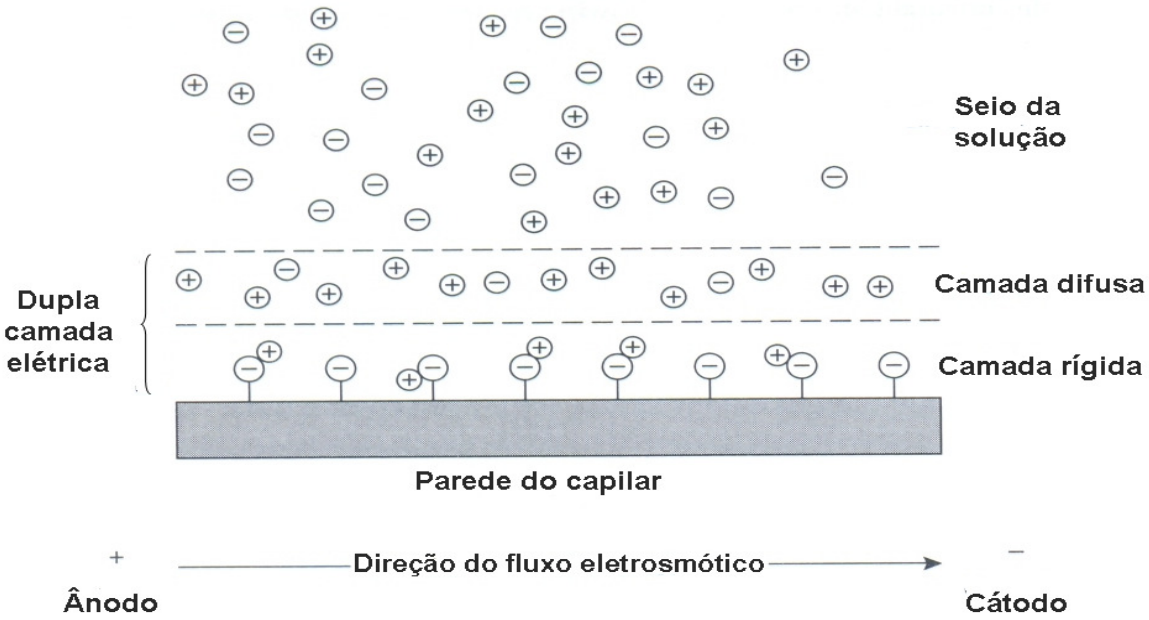


Figura 3 - Esquema representandoa origem do fluxo eletrosmótico (adaptado de HARVEY, 2000).

O tempo de migração total de um analito está, portanto, relacionado a sua mobilidade eletroforética (µE) e a mobilidade eletrosmótica (µEO), promovida pelo EOF (Figura 4). O termo mobilidade aparente (µA), é medido a partir do tempo de migração (T_m) e corresponde a soma de µE e µEO (Equação 3), que podem ter sinais opostos (HARRIS, 2008; WEINGERBER, 2000), sendo que para solutos neutros µE é igual a zero e para solutos carregados negativamente, µE tem sinal negativo.

Equação 3: $\mu A = \mu E + \mu EO = (l\ L/T_m\ V)$

na qual: l = comprimento efetivo do capilar - distância até o detector (cm),
V = tensão aplicada (kV),
L = comprimento total do capilar (cm).

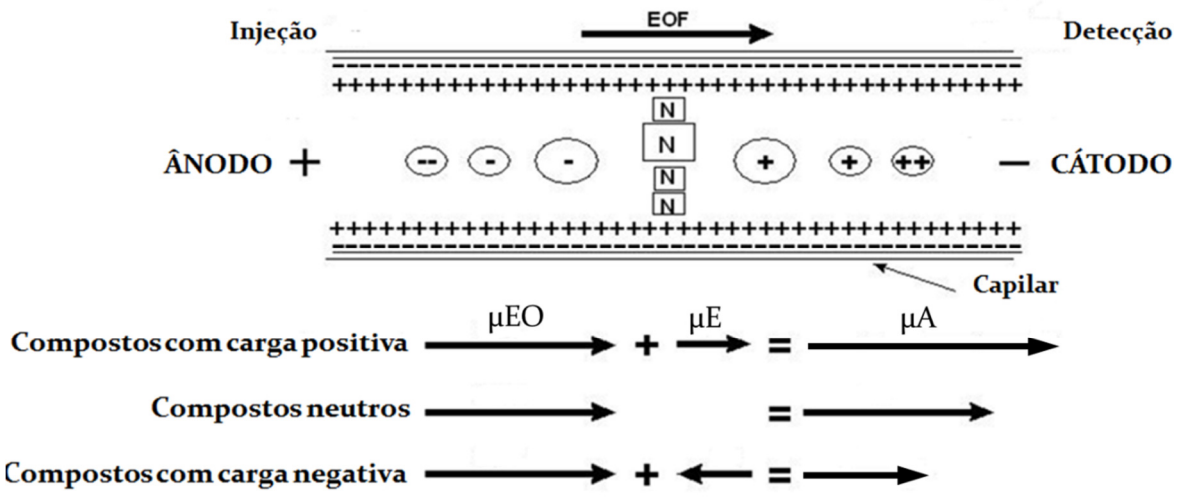


Figura 4 – Representação da migração dos analitos em FSCE (adaptado de Laboratoire Suisse d'analyse du Dopage).

1.3. Síndrome da bexiga hiperativa - Incontinência urinária

A bexiga hiperativa é uma síndrome caracterizada por urgência urinária com ou sem incontinência urinária, com aumento da frequência de micção e noctúria (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; ERDEM; CHU, 2006; GULUR; DRAKE, 2010). Seus sintomas são frequentemente associados à hiperatividade do músculo detrusor, quando este se contrai inapropriadamente durante o período de enchimento da bexiga (GUAY, 2003). O resultado é a incontinência urinária, definida como condição de perda involuntária de urina e aumento da frequência e urgência em urinar, que afeta aproximadamente 20-33% dos adultos e 55% dos idosos nos Estados Unidos, trazendo grande impacto físico e mental sobre a qualidade de vida (ARISCO; BRANTLY; KRAUS, 2009; ERDEM; CHU, 2006; GULUR; DRAKE, 2010; MACDIARMID, 2007).

A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela contração do músculo detrusor humano e os fármacos antimuscarínicos exercem seu efeito por inibir a ligação da acetilcolina aos receptores M_2 e M_3 das células musculares lisas do músculo detrusor ou da parede da bexiga (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; ERDEM; CHU, 2006), reduzindo assim, a atividade muscular espontânea durante a fase de enchimento da bexiga, com consequente diminuição da frequência urinária e da intensidade de contração do músculo detrusor (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; OKI; OKURA; YAMADA, 2005), sendo que outros mecanismos adicionais também podem estar envolvidos (ABRAMS; ANDERSSON, 2007).

Atualmente existem seis fármacos antimuscarínicos comercializados mundialmente para o tratamento da bexiga hiperativa, como indicado na Figura 5: oxibutinina, tolterodina, propiverina, trospium, darifenacina e solifenacina, que reduzem os principais sintomas em 65-75% dos casos (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; MACDIARMID, 2007; MICHEL; HEDGE, 2006; NOVARA et al., 2008) e que diferem estruturalmente, possuindo seletividade e perfis farmacocinéticos diferentes (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; ARISCO; BRANTLY; KRAUS, 2009). Por muito tempo a oxibutinina tem sido o tratamento de primeira escolha para a hiperatividade do músculo detrusor (ANDERSSON; CHAPPLE, 2001; KONTANI et al., 2006) e a única destes fármacos que também é comercializada na forma de adesivos transdérmicos (NOVARA et al., 2008).

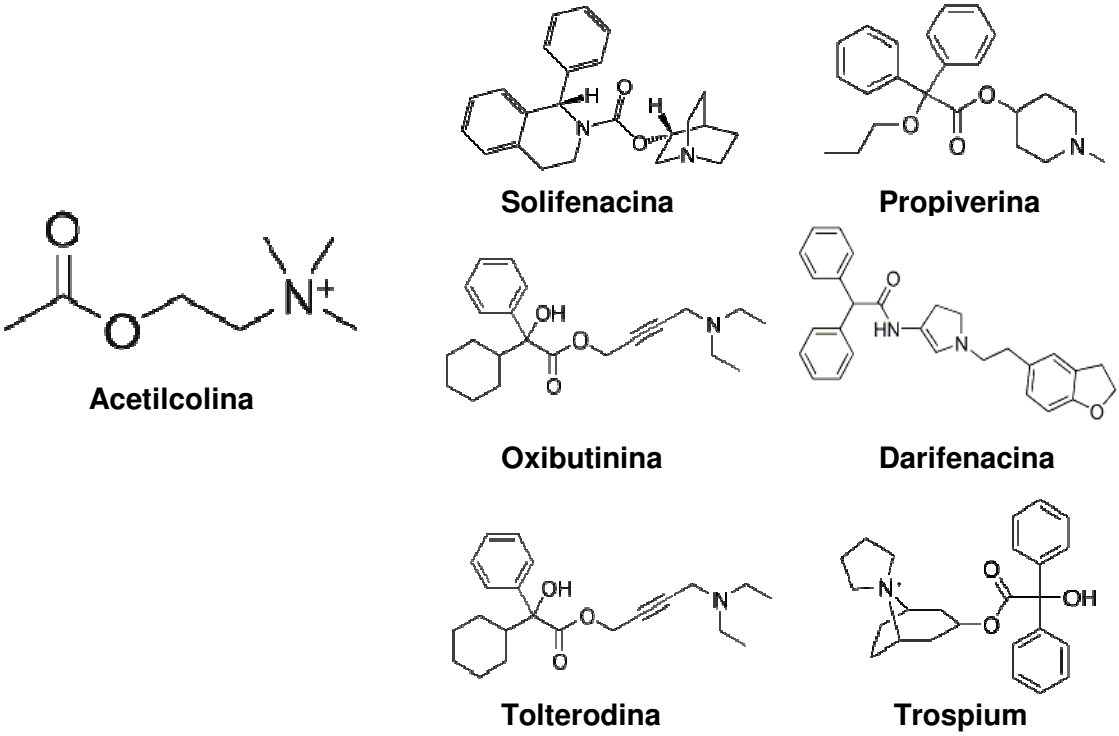


Figura 5 -Estrutura química da acetilcolina e dos antagonistas muscarínicos utilizados para o tratamento da síndrome da bexiga hiperativa (adaptado de ABRAMS; ANDERSSON, 2007).

1.4. Oxibutinina (OXY) e N-desetiloxibutinina (DEO)

A OXY ($C_{22}H_{31}NO_3$) é um fármaco com propriedades antiespasmódicas e anticolinérgicas,sendo utilizada para o tratamento de incontinência urinária devido à bexiga hiperativa (FONSECA et al., 2008; GIANNINI et al., 2009; GOLDENBERG, 1999; GUAY, 2003; KOLBAH; ZAVITSANOS, 1997; MIYAMOTO et al., 1993; SHIBUKAWA et al.,

2002b)ou à instabilidade neuropática do músculo detrusor (GIANNINI et al., 2009; MIYAMOTO et al., 1993).

É uma base hidrofóbica (SHIBUKAWA et al., 2002b), rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal (BIRNS et al., 2000; OKI; OKURA; YAMADA, 2005; SATHYAN et al., 2001) e melhor tolerada quando a dose inicial de administração não ultrapassa 5 mg, duas a três vezes ao dia (GUAY, 2003). Sua estrutura química, representada na Figura 6, apresenta grupos que podem influenciar nos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos: um carbono assimétrico, um grupo éster e uma amina terciária (MIYAMOTO et al., 1994).

O tempo de meia vida da oxibutinina (forma farmacêutica de liberação imediata)administrada por via oral é de duas a três horas em pessoas saudáveis (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; ANDERSSON; CHAPPLE, 2001; BIRNS et al., 2000; REIZ; SALEM; DARKE, 2007), sendo extensivamente metabolizada pelas enzimas hepáticas do citocromo P450 (principalmente pelas isoenzimas CYP3A4) a vários metabólitos, sendo a DEO seu principal metabólito ativo (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; FONSECA et al., 2008; GUAY, 2003; MIZUSHIMA et al., 2007a; SHIBUKAWA et al., 2002a) e o ácido (2-fenil, 2-cicloexil) glicólicoseu principal metabólito inativo (MICHEL; HEDGE, 2006). Tanto o fármaco como o metabólito ativo ligam-se fortemente às proteínas plasmáticas (mais de 99%) (MIZUSHIMA et al., 2007a) e competem pelo mesmo sítio de ligação da glicoproteína ácida (SHIBUKAWA et al., 2002a). Menos de 0,1% da dose administrada é eliminada de forma inalterada na urina (ABRAMS; ANDERSSON, 2007).

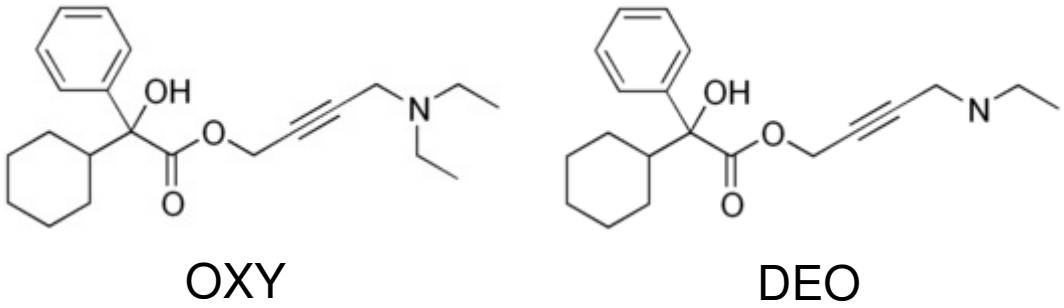


Figura 6 - Estrutura química da oxibutinina (OXY) e da N-desetiloxibutinina (DEO) (adaptada de WAGIEH et al., 2010).

Os efeitos anticolinérgicos (FONSECA et al., 2008; REIZ, 2007) e os perfis de concentração plasmática *versus* tempo da OXY e da DEO são parecidos, porém a concentração máxima e a área sob a curva do metabólito são 10 vezes maiores que a do

fármaco administrado (KIM; HAN, 2003; REIZ; SALEM; DARKE, 2007; SHIBUKAWA et al., 2002a).

A OXY e a DEO promovem o relaxamento dos ureteres e da musculatura lisa da bexiga, levando à redução da pressão intravesical e da frequência de contração da musculatura (COMAR; SUZUKI-KEMMELMEIER; BRACHT, 2003), porém, as atividades farmacológicas não são restritas ao trato urinário(bloqueio não seletivo dos receptores muscarínicos)levando a efeitos sistêmicos como constipação, sensação de boca seca, confusão, visão turva e taquicardia, que são os principais efeitos adversos que contribuempara a não adesão ao tratamento (ABRAMS; ANDERSSON, 2007; ANDERSSON; CHAPPLE, 2001; ARISCO; BRANTLY; KRAUS, 2009; GUAY, 2003; OKI; OKURA; YAMADA, 2005; SATHYAN et al., 2001; STÖHRER et al., 2007). Isso ocorre porque o subtipo M_3 do receptor é expresso predominantemente nas glândulas parótidas e moderadamente na bexiga e próstata. Já o subtipo M_2, por sua vez, predomina na bexiga, cólon e coração. A OXY tem maior afinidade pelos receptores M_3 e a DEO também contribui para a ocupação de longa duração dos receptores muscarínicos da glândula salivar, pois tem maior afinidade por este tecido do que pela bexiga urinária, logo a dose administrada muitas vezes é ajustada pela presença do sintoma de boca seca, presente em cerca de 80% dos pacientes (ARISCO; BRANTLY; KRAUS, 2009; OKI; OKURA; YAMADA, 2005; SATHYAN et al., 2001; STÖHRER et al., 2007).

Acredita-se também que a administração de doses mais altas e consequente aumento das concentrações plasmáticas do metabólito (Tabela 1) estejam relacionadas com uma menor tolerabilidade ao tratamento (GUAY, 2003), sendo os efeitos colaterais minimizados com a administração transdérmica (ANDERSSON; CHAPPLE, 2001; ERDEM; CHU, 2006; FONSECA et al., 2008; GUAY, 2003; MIZUSHIMA et al., 2007b) ou com formulações orais de liberação prolongada (OKI; OKURA; YAMADA, 2005).

Tabela 1 -Concentrações plasmáticas obtidas no estado de equilíbrio antes de nova dose de administração oral de liberação imediata

Dose diária administrada	Concentração plasmática média (µg/mL)	
	OXY	**DEO**
≤ 10 mg	2,4	2,0
11-15 mg	3,9	3,3
≥ 20 mg	6,3	5,4

Em relação a suas propriedades físico-químicas, pode ser observado na Tabela 2 que são compostos hidrossolúveis quando estão em baixos valores de pH, por estarem carregados positivamente devido a presença de quatro regiões aceptoras de hidrogênio em suas estruturas. Quando há o aumento do pH, a lipofilicidade aumenta gradativamente, observada pelo alto valor de Ko/a em valor de pH 10. A degradação química da OXY ocorre por clivagem da ligação éster e segue cinética de primeira ordem e seu tempo de meia vida de degradação é de 14 minutos calculado em valor de pH 12 (MIYAMOTO et al., 1994).Para condições aquosas ou de exposição à luz UV-visível e ao calor nenhuma degradação foi observada (PAI; DUBHASHI, 2010).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da OXY e da DEO

Propriedades físico-químicas	OXY	DEO
Massa molecular	357,49	329,43
Regiões aceptoras de hidrogênio	4	4
Regiões doadoras de hidrogênio	1	2
Ko/aa 25ºC e pH 10	12900	4210
Log P a 25ºC	5,049 ± 0,454	4,163 ± 0,482
Solubilidade em águaa 25ºC e pH 3	12 g/L	8,6 g/L
pKa	11,95±0,29 e 8,24±0,25	11,94±0,29 e 7,56±0,10

A análise de medicamentos em amostras biológicas fornece informações valiosas sobre biodisponibilidade, metabolismo, toxicologia, farmacocinética e farmacodinâmica (BOONE et al., 1999; REZAEE et al., 2010). Porém, para a análise da oxibutinina e de seumetabólito ativo em material biológico também são poucos os trabalhos descritos. Patrick et al (1989) e Oki,Okura e Yamada (2005) utilizaram cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS -“gas chromatography-mass spectrometry”) para a análise de OXY em plasma humano e em plasma de ratos, respectivamente. Hughes et al (1992) utilizaram a cromatografia líquida para análise da OXY e DEO em plasma humano e Massoud et al (1999) utilizaram a mesma técnica para análise da OXY em amostras de bexiga. Algunstrabalhos também realizaram, por análise frontal de alta eficiência, a determinação da ligação da OXY e da DEO às proteínas plasmáticas (SHIBUKAWA et al., 2002a; SHIBUKAWA et al., 2002b). Para o preparo das amostras vários dos métodos descritos na Tabela 3 utilizaram a extração líquido-líquido (LLE - “liquid liquid extraction”) para a extração da OXY e da DEO.

Tabela 3- Métodos descritos na literatura para separação e quantificação da OXY e da DEO em matrizes biológicas

Composto quantificado	Amostra	Técnica de extração	Técnica de separação/Coluna e fase móvel utilizada	LIQ	Referência
Enantiômeros OXY e DEO	Plasma	LPME	HPLC - Coluna Chiralpak AD/ hexano:isopropanol:etanol (95:4:1 v/v/v)+dietilamina 0,3%	250 ng/mL	FONSECA et al., 2008
Enantiômeros OXY e DEO	Plasma	LLE	LC -MS/MS- Coluna Chiralpak AD/ hexano:isopropanol:dietilamina(90:10:0,1 v/v/v)	-	KOLBAH; ZAVITSANOS, 1997
Enantiômeros OXY e DEO	Plasma	SPE	LC-MS/MS - Coluna Atlantis dC18/ metanol:água (75:25 v/v) + 10 mmol/L de acetato de amônio	0,2 ng/mL	MIZUSHIMA et al., 2007a
OXY	Amostras de bexiga	LLE	HPLC- Coluna Ultrasphere ODS/ acetonitrila - água - acetato de amônio 1mol/L (85:13:2, v/v/v)	5 ng/mL	MASSOUD et al., 1999
OXY e DEO	Plasma	LLE	HPLC - Coluna Techsil 5 pm CN / tampão fosfato 0,02 mol/L pH 6,2: metanol (60:40 v/v)	-	HUGHES et al., 1992
OXY e DEO	Plasma	LLE	LC-MS/MS- Coluna C18 X Terra/ 90% metanol	0,1 ng/mL	KIM; HAN, 2003
OXY e DEO	Plasma	SPE	LC- MS/MS- Coluna RP 18/ Sem informações de fase móvel	0,5 ng/mL	KONTANI et al., 2006
OXY e DEO	Plasma	LLE	CG-MS / Hélio	-	OKI; OKURA; YAMADA, 2005

LIQ - limite inferior de quantificação
LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas ("liquid chromatography - mass spectrometry/ mass spectrometry")
LPME - microextração em fase líquida (LPME – "liquid phase microextraction")
SPME - microextração em fase sólida(SPME – "solid phase microextraction")
SPE - extração em fase sólida (SPE – "solid phase extraction")

Em relação à análise da OXY em formulações farmacêuticas, poucos trabalhos são descritos na literatura e fazem uso principalmente da cromatografia líquida (PAI; DUBHASHI, 2010, TANG et al., 2011) como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos descritos na literatura para separação e quantificação da OXY e da DEO em formulações farmacêuticas

Composto quantificado	Técnica de separação	Comprimento de onda	Referência
OXY e impurezas	HPLC - Coluna Zorbax SB-Cyano/ tampão aquoso trietilamina 0,2%: acetonitrila (49:51 v/v) pH 6,3	205 nm	PAI; DUBHASHI, 2010
OXY e impurezas	CE/ MEECK - HP-β-CD	195 nm	GIANNINI et al., 2009
Enantiômeros da OXY	HLPC - Coluna Diamonsil C18/ acetonitrila: tampão fosfato 0,03 mol/L pH 4,0 (20:80 v/v),+ 0,06 mol/L HP-β-CD	223 nm	TANG et al., 2011

HP-β-CD - hidroxipropil-beta-ciclodextrina
MEECK - cromatografia eletrocinética capilar em microemulsão

1.5. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME – "dispersive liquid-liquid microextraction")

A preparação da amostra é uma etapa de extrema importância para a obtenção de resultados sensíveis e exatos (ZANG et al., 2009) e seu principal objetivo consiste em extrair e concentrar o analito de interesse enquanto o torna compatível com o sistema analítico a ser utilizado (REZAEE et al., 2006; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Várias são as técnicas utilizadas para o procedimento de preparação da amostra, dentre elas destaca-se a LLE, que é uma das mais antigas técnicas de extração e é amplamente aceita. Sua desvantagem consisteno uso de altas quantidades de solvente orgânico e no tempo necessário para execução. Também são utilizadas a extração por fluido supercrítico (SFE - "supercritical fluid extraction") e a SPE, que utilizam volumes bem menores de solvente, no entanto, são relativamente caras (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; REZAEE et al., 2006).

Na última década, esforços foram realizados visando o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra eficientes, rápidas e econômicas (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). A miniaturização das técnicas já existentes alcançou esses objetivos (OJEDA; ROJAS, 2009; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD,2008). Dentre as técnicas desenvolvidas destacam-se: a SPME primeiramente citada por Arthur e Pawliszyn, a LPMEdesenvolvida por Jeannot e Cantwell e a microextração em gota suspensa (SDME - "single drop microextraction") (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011; REZAEE et al., 2006).

Tendo em vista a necessidade de técnicas mais eficazes para a análise ambiental, Rezaeeet al. desenvolveram, em 2006, a DLLME e a utilizaram para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água.

Esta técnica consiste no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases doadora (amostra) e aceptora(solvente orgânico) e é ideal para a extração de compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas (Ko/a>500) ou que possam ter seu coeficiente de distribuição (log D) alterado pelo controle do pH (analitos ácidos ou básicos) (ZANG et al., 2009).

A razão entre o volume de fase aceptora(solvente extrator)e de fase doadora (amostra aquosa) que é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente, é muito baixa se comparada a outras técnicas (OJEDA; ROJAS, 2009), o que permite altos valores de fator de enriquecimento (EF – "enrichment factor") e o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente devido à utilização de um sistema ternário de solventes (amostra aquosa, solvente dispersor e solvente extrator), tornando a extração independente do tempo (HUO et al., 2011; LIANG; SANG, 2008; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009).

O solvente dispersor tem como principal característica ser solúvel tanto na fase doadora quanto na fase aceptora, o que permite a dispersão do solvente extrator em partículas finas na fase aquosa, de modo que a área superficial do solvente extrator em contato com a amostra contendo o analito seja infinitamente grande e promova o aumento da eficiência de extração. Os solventes dispersores comumente utilizados são: metanol, etanol, acetonitrila, acetona e tetraidrofurano (HUO et al., 2011; LIANG; SANG, 2008; REZAEI et al., 2008; YAN et al., 2011; ZANG et al., 2009).

O solvente extrator, por sua vez, deve satisfazer as seguintes condições: ter maior densidade que a água, não ser solúvel nesta e ser capaz de extrair o composto de interesse. Os mais utilizados como solventes extratores são os hidrocarbonetos halogenados como clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno (HUO, 2011; LIANG; SANG, 2008; LILI et al., 2010; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009). Outros solventes não halogenados também podem ser usados como 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-dodecanol e n-hexadecano (OJEDA; ROJAS, 2009).

A Figura 7 mostra o sistema ternário de solventes, no qual o solvente extrator e o solvente dispersor são rapidamente injetados na amostra aquosa com uma seringa (A). A injeção da mistura forma uma solução turva (B). Após a centrifugação, as gotículas do solvente extrator se depositam no fundo do tubo de fundo cônico (C) e são retiradas com uma

microseringa para posterior análise (D) (FARAJZADEH; DJOZAN; BAKHTIYARI, 2010; KOCÚROVÁ et al., 2012;REZAEE et al., 2006; ZANG et al., 2009).

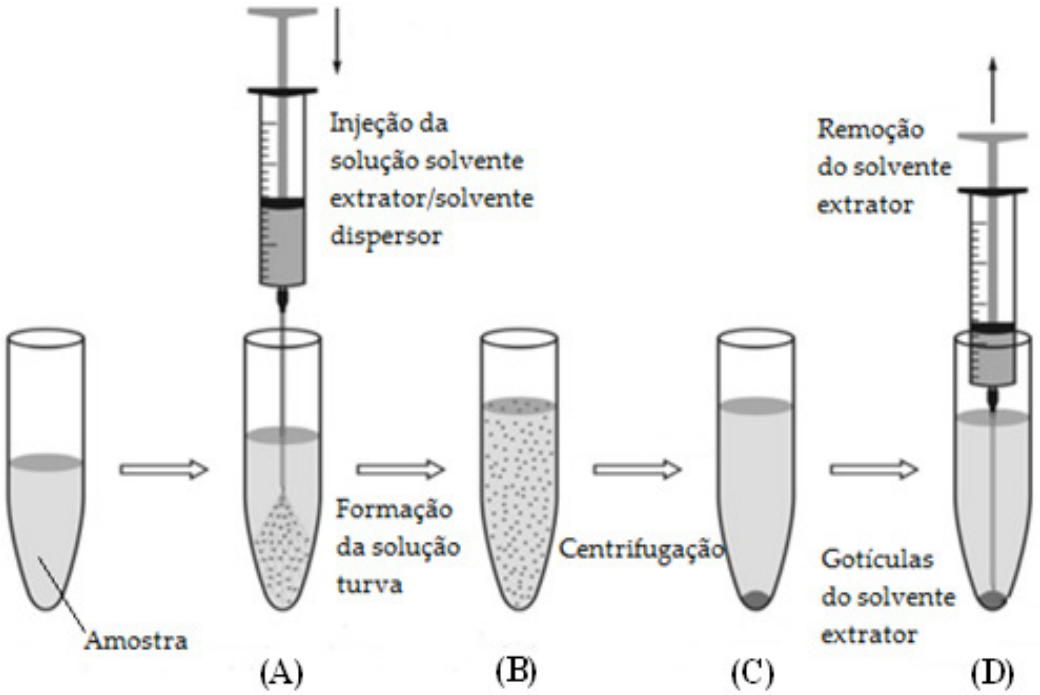


Figura 7 - Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (adaptado de ZGOŁA-GRZES´KOWIAK; GRZES´KOWIAK, 2011).

O fator de enriquecimento pode ser obtido pela utilização da Equação 4 (BERIJANI et al., 2006).

Equação 4:

$$EF = \frac{Vaq \times R}{Vsed \times 100}$$

na qual: R = Recuperação do analito,
Vaq = volume da fase doadora
Vsed = volume da fase aceptora sedimentada

Alguns fatores podem afetar a eficiência desta microextração: o solvente extrator e dispersor escolhido, o volume de solvente extrator e dispersor utilizado, a temperatura, o pH da amostra e a adição de sais (BERIJANI et al., 2006;CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010;HUO et al., 2011; REZAEE et al., 2006; ZANG et al., 2009).

As vantagens desta técnica incluem pequeno tempo de extração, simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação do analito, alto fator de enriquecimento e baixo impacto ecológico, já que as quantidades de solventes utilizados são muito pequenas

(OJEDA; ROJAS, 2009; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008; ZANG et al., 2009).

As desvantagens da técnica são: todo o processo de extração é manual e a centrifugação limita o volume de amostra a ser utilizado e é a etapa que demanda a maior quantidade de tempo no processo (BERIJANI et al., 2006; KOCÚROVÁ et al., 2012; LIANG; SANG, 2008; REZAEI et al., 2008; ZAREI; GHOLAMIAN, 2011).

A utilização da técnica é mais difundida para o preparo de amostras em matrizes simples como amostras de água(Figura 8), mas, para matrizes complexas como as biológicas, entre elas, a urina (Figura 9),ainda encontra-se em estágio inicial (SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011) apesar de apresentar boa perspectiva para uso (CHEN et al., 2011).

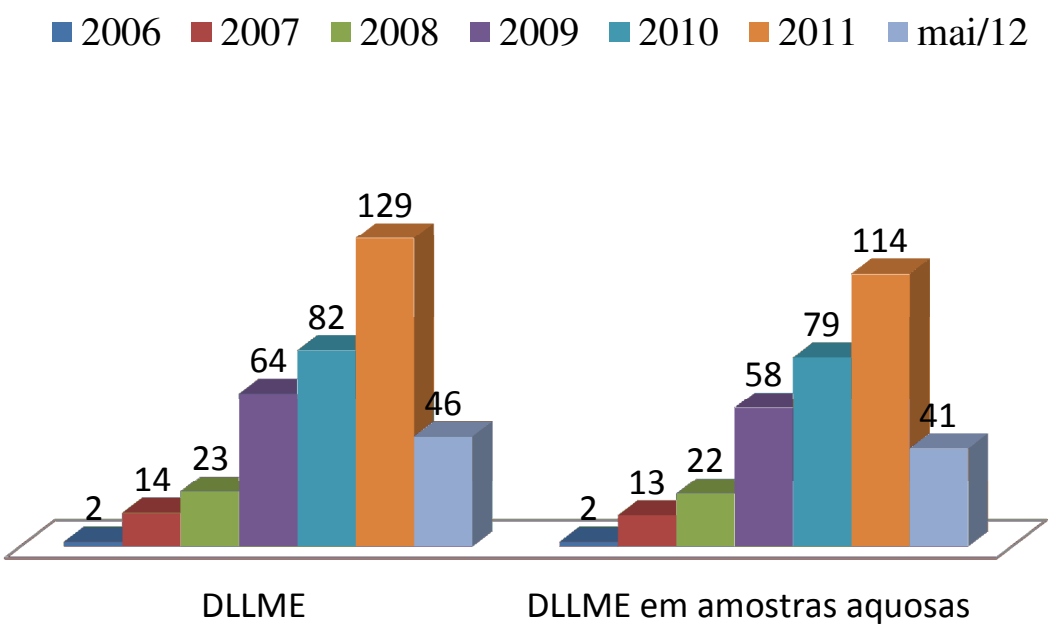


Figura 8 - Publicações da DLLME encontradas desde a criação da técnica por busca realizada na plataforma de pesquisaWeb of Knowledge.

Portanto, é necessário explorar a técnica para a extração em matrizes biológicas e buscar a associação desta técnica de extração com outras técnicas analíticas (ZANG et al., 2009). Trabalhos descritos na literatura mostram a associação de DLLME com GC (BERIJANI et al., 2006; OJEDA; ROJAS, 2009), espectrometria de absorção atômica (AAS – "atomic absorption spectrometry") (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010) e HPLC (MASHAYEKHI et al., 2010; XIONG et al., 2009), todavia, até o momento, poucos trabalhos são descritos(três) utilizando a DLLME com a CE, como representado na Figura 9 e nenhum deles utiliza amostras biológicas. Logo, o presente trabalho apresenta-se como uma inovação

analítica pela utilização da DLLME para a extração da OXY e da DEO de amostras de urina, tendo como técnica de análise a CE.

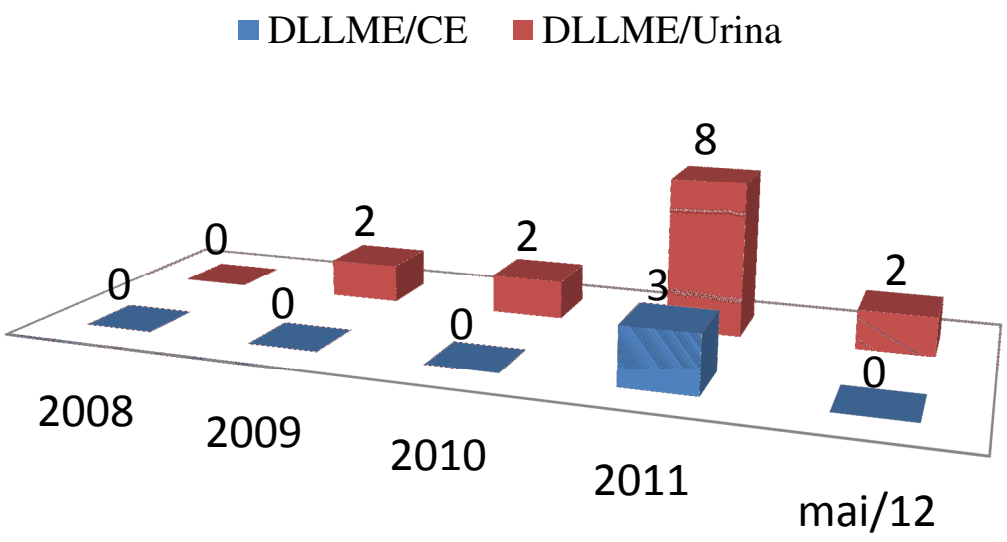


Figura 9 - Publicações da DLLME envolvendo CE e amostra biológica (urina) encontradas por busca realizada na plataforma de pesquisa Web of Knowledge.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a DLLME, como técnica de preparo da amostra, para análise da OXY e DEO em urina por eletroforese capilar. Para isto, foram realizadas as seguintes etapas:

a) Otimizar as condições para análise da OXY e da DEO por CE.

b) Avaliar a DLLME para a extração da OXY e DEO em urina otimizando os seguintes parâmetros: tipo e volume de solvente dispersor, tipo e volume de solvente extrator, tempo de extração, força iônica e pH da amostra.

c) Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez, recuperação, estabilidade e seletividade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise da OXY e da DEO por CE

3.1.1. Equipamentos

As análises da OXY e da DEO foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies (Waldbroonn, Alemanha), modelo G1600A, consistindo de amostrador automático, um detector de arranjo de diodos, um sistema de controle de temperatura (4-60ºC), e uma fonte de tensão (0-30 kV). O software CE ChemStation foi usado para aquisição e análise dos dados.

Os componentes empregados no preparo das soluções padrão foram pesados em balança analítica Sartorius, modelo CP225D (Goettingen, Alemanha). Também foi utilizado um peagâmetro da marca Thermo Orion 420 A+ (Waltham, Estados Unidos) para ajuste do pH do BGE e para a degaseificação das soluções utilizadas na análise eletroforética foi empregado o aparelho de ultrassom Maxiclean modelo 1450, marca Unique (Indaiatuba, Brasil).

3.1.2. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados no preparo dos BGEs foram de grau analítico. O acetato de sódio foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), o ácido fosfórico foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil), o borato de sódio, o fosfato de sódio, o Tris (2-amino 2-hidroximetil propano 1,3-diol) e a trietilamina (TEA) foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, Estados Unidos).

A água utilizada no preparo dos BGEs e na lavagem do capilar foi água ultrapura obtida por sistema Milli Q - Millipore Corporation (Bedford, Estados Unidos). O hidróxido de sódio (NaOH) utilizado para condicionamento do capilar e lavagem entre as corridas foi obtido de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol grau cromatográfico utilizado no preparo das soluções padrão do fármaco e metabólito foram obtidos da J.T. Baker (Philipsburg, Estados Unidos).

As soluções usadas no equipamento de CE foram filtradas em filtro Millex – HV com poros de 0,45 μm, obtidos da Millipore (Bedford, Estados Unidos) e levadas ao ultrassom, para eliminação de bolhas dissolvidas no meio.

3.1.3. Capilar

O capilar de sílica fundida revestido externamente por uma camada de poliimida foi adquirido em rolos de 25 m da empresa Microsolv (Eatontown, Estados Unidos). Em todas as análises realizadas foi empregado um capilar preparado no laboratório, com 50 µm de diâmetro interno e 45 cm de comprimento total (36,5 cm de comprimento efetivo - distância entre a extremidade de injeção da amostra e a janela de detecção). O capilar foi dimensionado com o auxílio de uma lâmina específica para corte da marca Agilent (Waldbroonn, Alemanha), que permite corte homogêneo sem danificar as extremidades. A janela óptica de detecção foi feita pela remoção do revestimento de poliimida a 8,5 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com o auxílio de algodão embebido em acetona.

3.1.4. Soluções padrão

As soluções estoque (1mg/mL) de OXY e DEO (gentilmente cedidos por Orgamol - Suíça, França e por Watson Laboratories - Corona, Estados Unidos, respectivamente) foram preparadas em metanol, e armazenadas em freezer (-20ºC) em frascos âmbar. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque, em metanol, nas concentrações de 50; 25; 15; 10; 5; 2,5 e 1 µg/mL de OXY e DEO.

A lidocaína, utilizada como padrão interno (IS – "internal standard"), foi obtida da Sigma Aldrich (St Louis, Estados Unidos) e preparada em metanol na concentração de 10µg/mL.

3.1.5. Otimização das condições de análise

Para a otimização das condições de análise, 100 µL da solução padrão de OXY e de DEO, na concentração de 5 µg/mL,foram transferidos para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de água ultrapura.

Os BGEs foram preparados pesando-se ou pipetando-se quantidades adequadas dos reagentes, dissolvendo-os em água ultrapura e ajustando-os ao pH requerido com ácido (solução de ácido fosfórico 1,5 mol/L) ou a base (solução de NaOH 0,1mol/L), antes de completar até o volume final.

Foram avaliadas várias composições de BGEs,utilizando diferentes condições de análise, como descrito na Tabela 5. A detecção foi monitorada em comprimento de onda de 204 nm, que é a região do espectro que a OXY e a DEO apresentam maior absorção. Além

disso, baixos comprimentos de onda, próximos a 200 nm aumentam a detectabilidade em CE (BONATO; de GAITANI; JABOR, 2009).

Tabela 5 - Condições avaliadas durante a otimização do método para análise da OXY e da DEO por CE

Eletrólito de corrida	Concentração (mmol/L)	pH	Tensão (kV)	Temperatura (°C)
Fosfato de sódio	50	3-7	7-10	25
Borato de sódio	50	3	15-20	25
Tris	50	3	7-25	25
TEA	50	3	30	25

Injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 10 ou 20s, polaridade positiva.

Após definição do BGE de TEA em pH ácido, no valor de três, foram otimizadas a concentração do BGEe atemperatura de análise, como ilustrado pela Tabela 6.

Tabela 6 - Condições avaliadas durante a otimização do método para análise da OXY e da DEO por CEutilizando TEA pH 3 como BGE

Concentração(mmol/L)	15, 25, 50, 75 e 100
Temperatura(°C)	10, 20, 30, 40 e 50

Injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 10 ou 20s, polaridade positiva.

3.1.6. Seleção do padrão interno

Para melhorar a precisão e corrigir erros por variações de volumes de injeção, tensão e perdas relacionadas àevaporação do solvente (MAYER, 2001) epor manipulações da amostra como,por exemplo, a extração (CASSIANO et al., 2009) foi avaliada a adição de ISna análise da OXY e da DEO. Para isso, foram testados compostos com valores de pKa próximos aos dos compostos de interesse e com log P maior que dois, como a amiodarona, o haloperidol, a lidocaína e a risperidona.

3.2. Desenvolvimento do método para análise da OXY e da DEO em urina por DLLME

3.2.1. Equipamentos

Para a etapa de extração foram utilizados:banho-maria Fanem modelo 1102 (São Paulo, Brasil); agitador de tubos da marca Phoenix, modelo AP 56 (Araraquara, Brasil) e centrífuga Fanem Excelsa Baby I modelo 206 (Guarulhos, Brasil). Além disso, para a análise da OXY e da DEO foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no item 3.1.1.

3.2.2. Reagentes e solventes

Para o procedimento de extração foram utilizados os seguintes solventes: diclorometano (CCl_2H_2), tetracloroetileno (C_2Cl_4), clorobenzeno (C_6H_5Cl) e dissulfeto de carbono (CS_2) obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), tetracloreto de carbono (CCl_4) adquirido da Synth (São Paulo, Brasil), etanol anidro (C_2H_6O), metanol (CH_4O) e acetonitrila (C_2H_3N) obtidos da J.T. Baker (Philipsburg, Estados Unidos), acetato de hexila ($C_8H_{16}O_2$) obtido da Sigma Aldrich (St Louis, Estados Unidos) e acetona (C_3H_6O) e clorofórmio (CCl_3H) obtidos da Mallinckrodt (Philipsburg, Estados Unidos).O sal cloreto de sódio foi adquirido da marca Merck(Darmstadt, Alemanha). Também foram utilizados os reagentes e solventes descritos no item 3.1.2.

3.2.3. Amostra biológica

A urina foi obtida de voluntários sadios que não fazem uso de nenhum medicamento. A coleta foi realizada no período da manhã, após aproximadamente oito horas sem urinar e o material foi congelado em freezer a -20ºC até sua utilização. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Protocolo CEP/FCFRP nº 205 (Anexo A).

3.2.4. Procedimento de preparo da amostra por DLLME

Devido às baixas concentrações de analitos e a complexidade das matrizes biológicas, o pré-tratamento da amostra é usualmente requerido antes da análise instrumental (CHEN et al., 2011).

A DLLME apresenta vários parâmetros que podem influenciar na eficiência da extração, entre os quais se encontram: as características e o volume dos solventes extratores e dispersores, a pH da amostra e a força iônica da solução (MENG et al., 2011; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011).

Assim, para otimizar as condições de extração, ensaios foram realizados em triplicata (n = 3), de acordo com as etapas descritas na Figura 10. O preparo da amostra foi realizado

pelo descongelamento das amostras de urina e centrifugação a 1092 *g* por dez minutos com posterior filtração do sobrenadante em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) para remoção de materiais particulados como carbamida e ácido úrico (SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011; SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011).

Em tubos de fundo cônico foram adicionados 50 µL de solução padrão contendo o fármaco e o metabólito na concentração de 50 µg/mL e 25 µL de solução de IS, na concentração de 10 µg/mL e o solvente foi evaporado utilizando fluxo de ar comprimido. Alíquotas de 5 mL de urina foram adicionadas a cada tubo, com agitação para solubilização da OXY, da DEO e do IS. A alcalinização foi realizada pela adição de solução de NaOH 10 mol/L em volume suficiente para alcançar pH igual a 10. Uma solução composta por solvente extrator/dispersor foi injetada rapidamente a esta amostra de urina, com o auxílio de uma seringa de vidro de 1 mL, formando uma solução turva. Os tubos contendo esta solução turva foram mantidos em repouso por dois minutos, sendo posteriormente centrifugados por cinco minutos a 2260 *g*. O solvente extrator depositado no fundo do tubo (fase sedimentada) foi removido com o auxílio de uma microseringa de 0,1 mL, quantificado e um volume de 50 µL foi transferido para outro tubo de fundo cônico, no qual o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 50 µL de água ultrapura para análise por CE.

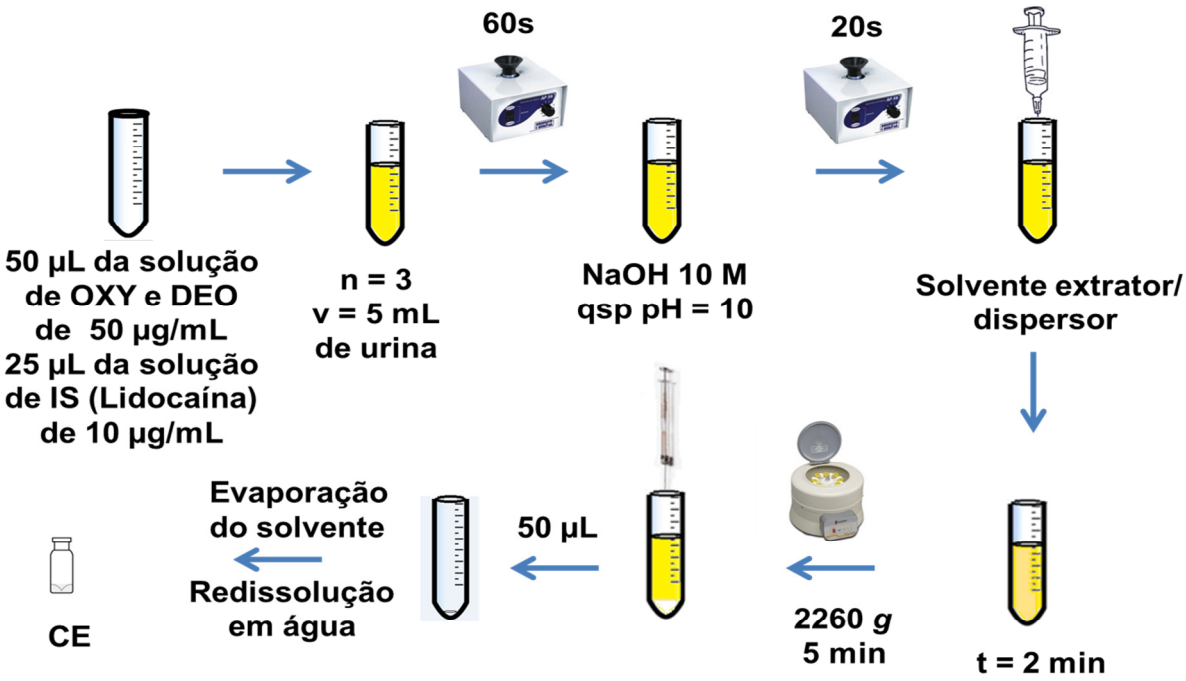


Figura 10 - Diagrama das etapas da DLLME.
qsp = quantidade suficiente para.

3.2.4.1. Seleção do solvente extrator

Para a determinação deste parâmetro, foi realizada a extração de acordo com o item 3.2.4. O volume total da mistura de solvente extrator/dispersor foi de 500 µL, sendo 100 µL de solvente extrator e 400 µL de solvente dispersor (acetonitrila). Nesta etapa os solventes extratores avaliados foram: acetato de hexila ($C_8H_{16}O_2$), clorofórmio ($CHCl_3$), clorobenzeno (C_6H_5Cl), diclorometano (CH_2Cl_2), dissulfeto de carbono (CS_2), tetracloroetileno (C_2Cl_4) e tetracloreto de carbono (CCl_4).

3.2.4.2. Seleção do solvente dispersor

Para a seleção do solvente dispersor a extração foi realizada de acordo com o item 3.2.4., sendonovamenteutilizadoo volume total de 500 µL da mistura de solvente extrator/dispersor, contendo 100 µL de solvente extrator e 400 µL de solvente dispersor.Utilizando o solvente extrator selecionado (CCl_4)foi avaliadasua combinação com diferentes solventes dispersores: acetonitrila (C_2H_3N), acetona (C_3H_6O), etanol (C_2H_6O) e metanol (CH_4O).

3.2.4.3. Influência do volume de solvente extrator

Após terem sido avaliados os solventes extratores e dispersores, é necessário avaliar se o volume da mistura interfere na quantidade recuperada dos compostos de interesse. Para avaliar o efeito do volume de solvente extrator foram preparadas quatro misturas de solventes extrator/dispersor, nas seguintes proporções:80, 100, 120 e 140 µL de solvente extrator e 420, 400, 380 e 360 µL de solvente dispersor, respectivamente. O procedimento de extração foi realizado seguindo o item 3.2.4. Para o cálculo de recuperação, as áreas obtidas nos eletroferogramas foram ajustadas ao volume de solvente extrator utilizado.

3.2.4.4. Influência do volume de solvente dispersor

Após a definiçãodo volume de solvente extrator a ser utilizado, foi avaliadaa influência do volume de solvente dispersor na extração dos analitos pelo solvente extrator. Para isso, foram preparadas quatro misturas contendo 140µL de solvente extrator (CCl_4) e260, 360, 560 e 860 µL de solvente dispersor (C_2H_3N). Cada uma destas misturasfoi injetada nas amostras de urina enriquecidas com OXY, DEO e IS, mantendo-se as condições de extração do item 3.2.4. Como o volume de solvente extrator utilizado permite a recuperação de um volume de fase sedimentada superior a 100 µL, foi estabelecida para as próximasetapas(influência do tempo de extração, influência do pH da amostra e influência da

força iônica) a coleta de 100 µL de fase sedimentada ao invés dos 50 µL anteriormente coletados.

3.2.4.5. Influência do tempo de extração

O tempo de extração é um fator muito importante para micro técnicas como a SPME e a LPME (YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). Em DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor e a centrifugação (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). Seguindo as condições descritas no item 3.2.4. e utilizando-se 140 µL de CCl_4 e 260 µL de C_2H_3N como mistura de solventes,foram avaliados os tempos de extração de 0, 2 e 5 minutos.

3.2.4.6. Influência do pH da amostra

Para que haja partição do fármaco na fase orgânica é necessário que o mesmo esteja na forma não ionizada. A OXY, DEO e IS possuem caráter básico e para que fiquem na forma não ionizada há necessidade de alcalinizar o meio. Assim, foram avaliados os valores de pH da amostra de 9 a 12, através da adição de volume de NaOH 10 mol/L em quantidade suficiente para atingir estes valores.A execução do processo de extração foi feita de acordo com o item 3.2.4., utilizando como tempo de extração dois minutos e mistura de solventes contendo 140 µL de CCl_4 e 260 µL de C_2H_3N.

3.2.4.7. Influência da força iônica

Normalmente a adição de sal diminui a solubilidade dos compostos de interesse na fase aquosa e aumenta sua transferênciapara a fase orgânica (HUO et al., 2011).

A influência do aumento da força iônica foi avaliada pela adição de cloreto de sódio (NaCl) nas proporções de 2,5%, 5% e 10%. A extração foi realizada de acordo com o item 3.2.4., utilizando como tempo de extração dois minutos, mistura de solventes contendo 140 µL de CCl_4 e 260 µL de C_2H_3N e pH da amostra de 11.

3.3. Validação do método

A validação é um passo mandatório para avaliar a habilidade do método desenvolvido de fornecer resultados precisos para a aplicação rotineira (ROZET et al., 2011).

O protocolo de validação deste método foi baseado na Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Segundo esta, a validação deve garantir,por meio de estudos experimentais, que a metodologia atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

O enriquecimento das amostras para a realização da extração foi realizado pela adição de 50 µL das soluções dos analitos e 25 µL da solução do ISem tubos de extração, com a realização da evaporação do solvente sob fluxo de ar comprimido. A seguir, foram adicionados 5 mL de urina, previamente centrifugada e filtrada, e o tubos foram agitados em agitador de tubos durante 60 segundos.

As amostras de urina fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração. Para tal, foi adicionado 2,5% de NaCl nas amostras e após homogeneização a amostra foi alcalinizada a pH 11 com o uso de NaOH 10 mol/L. A mistura contendo 140 µL de solvente extrator e 260 µL de solvente dispersor foi rapidamente injetada na amostra e após um período de dois minutos foi centrifugada a 2260 *g* por cinco minutos. A fase sedimentada foi coletada e 100 µL deste solvente extrator foram transferidos para outro tubo de fundo cônico e evaporado. Os analitos foram redissolvidos em 50 µL de água ultrapura e transferidos para os frascos para a realização da análise eletroforética.

3.3.1. Conformidade do sistema

Para avaliar a conformidade do sistema foram realizadas dez análises consecutivas, nas condições analíticas otimizadas, em cada dia da validação e foram observadas variações nos T_m e nas áreas dos analitos.

3.3.2. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se a matriz branca (isenta da substância de interesse) com a matriz enriquecida com os analitos, ambas submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.

3.3.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de uma curva analítica contendo sete níveis de concentração (n=3) no intervalo de concentração urinária de 90 a 300 ng/mL para a OXY (90; 120; 150; 180; 240; 270 e 300 ng/mL) e no intervalo de concentração urinária de 187,5 a 750 ng/mL para a DEO (187,5; 200; 250; 375; 500; 600 e 750 ng/mL).As curvas de linearidade da OXY e da DEO foram construídas plotando-se no eixo das abscissas as

concentrações dos analitos na urina e no eixo das ordenadas a razão entre as áreas do analito e padrão interno e foram analisadas utilizando o teste de ajuste do modelo linear, com a obtenção de gráficos de resíduos, valores de F e de *p* através do usodo programa estatístico Minitab® versão 14 (Pensilvânia, EUA).

A cada dia da validação também foram construídas curvas de calibração contemplando quatro níveis de concentração. Para a OXY as concentrações urinárias utilizadas foram: 120; 150; 180 e 300 ng/mL e para a DEO foram: 200; 250; 500 e 750 ng/mL.

Para enriquecimento das amostras, foram utilizadas soluções estoque em metanol nas concentrações de 9 a 30 µg/mL para a OXY e nas concentrações de 18,75 a 75 µg/mL para a DEO, sendo transferidos 50 µL de cada nível de concentração da OXY e da DEO e 25 uL da solução padrão de 10 µg/mL de IS para cada tubo. A extração foi realizada como descrita no item 3.3., com posterior construção da curva analítica e das curvas de calibração.

3.3.4. Limite de quantificação

Para a determinação do limite de quantificação foram realizadas análises de cinco amostras de urina branca enriquecidas de modo que a concentração final foi de 90 ng/mL de OXY e 187,5 ng/mL de DEO. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item3.3. eà análise eletroforética. O limite de quantificação foi calculado baseado em uma curva de calibração no intervalo de concentração urinária de 90 a 300 ng/mL para a OXY e de 187,5 a 750 ng/mL para a DEO, sendo os resultadosavaliadosatravés de cálculos de precisão e exatidão.

3.3.5. Precisão

A precisão foi determinada em quintuplicata e em três níveis de concentração: concentração baixa - CB, concentração média - CM e concentração alta – CA. Foi avaliada a para um mesmo dia (precisão intradia)e em três dias diferentes (precisão interdia), nas concentrações estabelecidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações de OXY e DEO na urina usadas para determinação da precisão e exatidão

Concentração	OXY (ng/mL)	DEO (ng/mL)
CB	120	200
CM	180	500
CA	300	750

A extração foi realizada conforme o item 3.3., com posterioranálise eletroforética.

Paraa avaliaçãoda precisão foi construída uma curva de calibração no intervalo de concentração urinária de 120 a 300 ng/mL para a OXY e de 200 a 750 ng/mL para a DEO. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 5:

Equação 5:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

na qual: DP = desvio padrão
CMD = concentração média determinada.

3.3.6. Exatidão

A exatidão também foi determinada em quintuplicata e em três níveis de concentração (CB, CM e CA), para um mesmo dia (exatidão intradia) e em três dias diferentes (exatidão interdia), utilizando as concentrações estabelecidas na Tabela 7.

A extração foi realizada de acordo com oitem3.3., seguida da realização da análise eletroforética. Para avaliar a exatidão foi construída uma curva de calibração no intervalo de concentração urinária de 120 a 300 ng/mL para a OXY e de 200 a 750 ng/mL para a DEO. A exatidão (E) foi expressa como a porcentagem de erro em relação à concentração teórica e utilizou as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e interdia, seguindo a Equação 6.

Equação 6:

$$E = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração real}}{\text{concentração real}} \times 100$$

3.3.7. Recuperação

Para avaliar a eficiência do processo de extração, foram realizadas extrações em três níveis de concentrações: baixa (120 ng/mL - OXY e 200 ng/mL - DEO), média (180 ng/mL - OXY e500 ng/mL - DEO) e alta (300 ng/mL - OXY e 750 ng/mL - DEO) em triplicata, contemplando a faixa de linearidade do método. Para tal, 50 µL das soluções padrão de OXY nas concentrações de 12; 18 e 30 µg/mL foram transferidos para diferentes tubos e acrescidos de 50 µL das soluções padrão de DEO nas concentrações de 20; 50 e 75 µg/mL, respectivamente. A todos os tubosforam adicionados 25 µL da solução de IS 10 µg/mL. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e em seguida foram adicionados 5 mL de

urina (branca), previamente centrifugada e processadas e a extração foi realizada em conformidade com o que foi descrito no item 3.3.

Para eliminar qualquer interferência de matriz nesta quantificação, amostras de urina branca foram submetidas ao procedimento de extração conforme descrito noitem 3.3. (sem a realização da etapa de enriquecimento) e após a recuperação da fase sedimentada foram adicionados 50 µL das soluções de OXY e DEO e 25 µL da solução de IS nas mesmas concentrações descritas acima. O solvente foi evaporado e os analitos foram dissolvidos em 50 µL de água ultrapura para a realizaçãoda análise eletroforética.

A recuperação foi definida como a razão entre a resposta das replicatas obtida de matrizes enriquecidas antes da extração e a resposta obtida de matrizes enriquecidas após a extração (BRESSOLLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996; ROZET et al., 2011).

Além disso, nesta etapa também foram calculados os fatores de enriquecimento para a OXY e para a DEO, considerando a Equação 4.

3.3.8. Robustez

Para analisar a robustez do método, variações em dois níveis (alto e baixo) na concentração do BGE (48-52 mmol/L), bem como no seu valor de pH (2,9-3,1) e na temperatura de análise (29-31ºC) foram realizadas. Para tal, foi utilizado o programa estatístico Minitab® versão 14 (Pensilvânia, EUA) e foi feito o planejamento fatorial completo composto por três fatores e dois níveis,totalizando oito experimentos, como pode ser observado na Tabela 8. As respostas avaliadas foram T_m e área dos analitos.

Tabela 8 - Experimentos realizados para determinaçãoda robustez do método

Número de experimentos	Temperatura (ºC)	Concentração do BGE (mmol/L)	pH do BGE
1	29	48	3,1
2	31	52	2,9
3	31	48	3,1
4	31	48	2,9
5	29	52	2,9
6	29	52	3,1
7	29	48	2,9
8	31	52	3,1

3.3.9. Estudos de estabilidade do fármaco em fluidos biológicos

Para realizar esta etapa estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, longa duração e pós-processamento foram realizados. Todas as análises foram feitas em triplicata utilizando dois níveis de concentração urinária(CB - 120ng/mL e CA - 300 ng/mL para a OXY e de CB - 200ng/mL e CA - 750 ng/mL para a DEO), sendo aconcentração de OXY e de DEO calculada baseada em uma curva de calibração extraída nas concentrações de 120 a 300 ng/mL para a OXY e de 200 a 750 ng/mL para a DEO.

Os resultados obtidos em cada condição foram comparados com aqueles obtidos utilizando-se amostras recém-preparadas através de testes de análise de variância -*One-Way ANOVA* (Origin® 6.1, Northampton, EUA). Valores de $p \leq 0{,}05$ foram considerados como uma diferença significativa entre os resultados, o que determina a não estabilidade dos analitos nas amostras. Além disso, tambémfoi calculado o coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem,entre as amostras frescas e submetidas ao estudo de estabilidade.

- ✓ **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Nesta etapa foi avaliada a estabilidade do fármaco e de seu metabólito após três ciclos de congelamento e descongelamento, em dois níveis de concentração.

Amostras de urina branca, previamente centrifugadas e filtradas, foram enriquecidas com os padrões de OXY e DEO e foram congeladas à temperatura de -20ºC por 24 horas. Após este período as amostras foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, foram novamente congeladas por 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos. Após o último ciclo, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descritono item3.3, com a adição do IS (25 µL da solução de lidocaína na concentração de 10 µg/mL). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas por meiodoteste de análise de variância (*One-Way ANOVA*).

- ✓ **Estabilidade de curta duração**

A estabilidade de curta duração foi avaliada em amostras de urina branco enriquecidas com OXY e DEO, nas mesmas concentrações determinadas acima. Os tubos contendo as soluções permaneceram à temperatura ambiente por 12 horas. Após este período, as amostras foram acrescidas de IS (25 µL da solução de lidocaína na concentração de 10 µg/mL). O processo de extração foi realizado como descrito no item 3.3.Os resultados foram comparados

com os obtidos da análise de amostras recém-preparadas por meio do teste de análise de variância (*One-Way ANOVA*).

- ✓ **Estabilidade de longa duração**

A estabilidade de longa duração foi avaliada pelo enriquecimento de amostras de urina branca com OXY e DEO nas mesmas concentrações e armazenadas a -20 °C por uma semana. Após este período as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, oIS foi adicionado (25 µL da solução de lidocaína na concentração de 10 µg/mL)e as amostras foram submetidas ao processo de extração descrito no item 3.3.Os resultados de concentração obtidos foram comparados com os obtidos da análise de amostras recém-preparadaspor meio doteste de análise de variância (*One-Way ANOVA*).

- ✓ **Estabilidade pós-processamento**

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, torna-se necessário realizar o estudo de estabilidade do fármaco na amostra processada para análise, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica (ANVISA, 2003). Assim, cinco amostras de urina enriquecidas nas concentrações de 120 e 300 ng/mL para a OXY, de 200 e 750 ng/mL para a DEOe de 50ng/mLpara o IS foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3. e foram analisadas por CE. As concentrações da OXY eda DEO foram calculadas baseadas em uma curva de calibração no intervalo de concentração de 120 a 300 ng/mL para a OXY e de 200 a 750 ng/mL para a DEO. Após um período de 24 horas, no qual as amostras foram mantidas no autoinjetor à temperatura ambiente, foi realizada uma nova análise por CE. As concentrações da OXY e da DEO foram calculadas baseadas em uma nova curva de calibração extraídano mesmo intervalo de concentração.Os resultados obtidos antes e após as amostras serem mantidas no autoinjetor foram comparados atravésdoteste de análise de variância (*One-Way ANOVA).*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da OXY e da DEO por CE

4.1.1. Condicionamento do capilar

A condição da parede interna do capilar é de extrema importância em CE. Ela controla a velocidade eletrosmótica e propicia sítios de adsorção para moléculas com cargas múltiplas, como as proteínas (HARRIS, 2008). O preparo da sílica fundida ocorre a altas temperaturas e por isso, antes de seu primeiro uso é necessário realizar a reidratação da superfície interna e a quebra de algumas ligações epóxido que possam estar presentes através do uso de soluções de alto valor de pH (WEINBERGER, 2000).

Para o primeiro uso do capilar, o condicionamento foi realizado por lavagem do mesmo com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L por 30 minutos, seguida por lavagem com água ultrapura pelo mesmo tempo. No início de cada dia o capilar foi lavado por 10 minutos com solução de NaOH 0,1 mol/L, seguida por lavagem com água ultrapura pelo mesmo tempo e ao final do dia, o procedimento foi repetido, sendo o capilar estocado em água.

É reconhecido que o pré-condicionamento do capilar é importante para a alta eficiência de separação e também para a repetibilidade entre as corridas. Diferentes passos de lavagem do capilar com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, água e BGE devem ser realizados para se obter a condição ótima de lavagem do capilar (BONATO; de GAITANI; JABOR, 2009).

Entre as análises, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol/L por dois minutos para regeneração de sua parede e remoção dos compostos não quantificados e materiais adsorvidos (HARRIS, 2008; MAYER, 2001), seguida pela passagem de água por dois minutos e de BGE por três minutos, para preenchimento e alcance do equilíbrio das cargas do capilar. Esta etapa de condicionamento melhora a precisão nos tempos de migração e é importante para trabalhos quantitativos, já que a área do pico está relacionada com o tempo de migração (ALTRIA, 1996). Também foi feita a aplicação de tensão por dois minutos após a etapa de lavagem com a solução de BGE.

4.1.2. Composição e pH da solução de eletrólitos

A OXY e a DEO são compostos básicos com valores de pKa de 11,95±0,29/8,24±0,25 e 11,94±0,29/7,56±0,10, respectivamente. Logo, em valores de pH ácido encontram-se carregadas positivamente, já que apresentam quatro sítios passíveis de protonação. Além

disso, compostos com pKa > 5 em pHs baixos apresentam-se completamente ionizados, não sofrendo variações de mobilidade com pequenas variações de pH (LURIE; HAYS; PARKER, 2004). Assim, por este motivo, optou-se por utilizar valor de pH baixo (pH < 4), que proporciona EOF pouco significativo (FAKHARI et al., 2008) e garante que todas as espécies estejam protonadas.

A DEO apresenta massa molecular de 329,43 g/mol, enquanto que a OXY possui massa molecular de 357,49 g/mol, deste modo, considerando a Equação 1, referente a mobilidade eletroforética, tem-se que a DEO, por apresentar menor razão massa/carga possui menor tempo de migração quando comparada à OXY.

Nas condições testadas, os tampões fosfato de sódio eborato de sódio e a solução de eletrólitos contendo Tris não apresentaram separação dos compostos com resolução superior a 1,5. A solução de TEA 50 mmol/L,pH 3 foi a que proporcionou melhor separação entre a OXY e DEO. Quando o capilar foi mantido a temperatura de 25°C e foi aplicada tensão de 30 kV, polaridade positiva,foram obtidos picos com T_m de 8,18 minutos para a DEO e 8,51 minutos para a OXY e resolução de 3,3 entre os picos citados.

4.1.3. Concentração da solução de eletrólitos

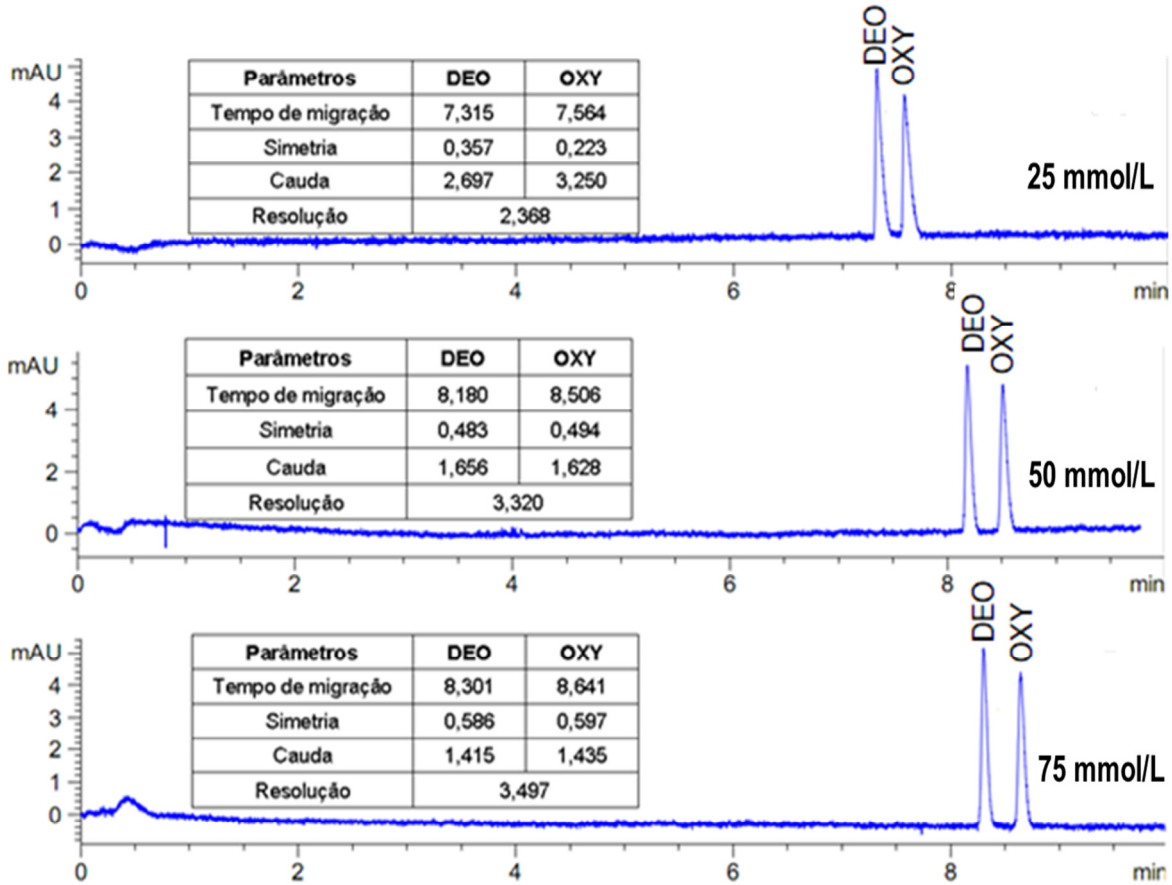
O aumento da força iônica das soluções de eletrólitos, determinada pelo aumento da concentração da mesma, não afeta apenas o aquecimento do capilar (efeito Joule) como também pode influenciar a mobilidade eletroforética (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993).Foram avaliadas as soluções de TEA, pH 3 nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 mmol/L como BGE. À medida que a concentração da solução de eletrólito aumentou houve um aumento no tempo de migração da OXY e da DEO, como pode ser observado na Figura 11. Zhu, Hu e Liu (2006) afirmam que não há uma relação linear simples entre a concentração do BGE e a mobilidade do analito, mas que é aceito que a mobilidade eletroforética diminui com o aumento da concentração. Uma possível explicação é dada por Weinberger (2000) que declara que íons em solução são sempre cercados por uma dupla camada de íons de carga oposta (contra-íons) e que a migração destes contra-íons ocorre na direção oposta a do analito, de modo que o aumento da concentração do BGE reduz a mobilidade do soluto devido à resistência gerada pela migração de maior quantidade de contra-íons. Outro fator que pode contribuir éo aumento da viscosidade do meio o qual leva à diminuição da mobilidade eletroforética do analito como pode ser observado na Equação 1.

O aumento na concentração de TEA de 25 mmol/La75 mmol/L (Figura 11), com consequente aumento da força iônica, proporcionou melhorano formato do pico (diminuição

de cauda) (ALTRIA, 1996). Entretanto, o uso de concentração maior de TEA (75 mmol/L) aumentou a condutividade e o calor gerado quando a tensão foi aplicada, de modo que não foi possível realizar várias corridas com o mesmo BGE porque ocorreu a perda de resolução e variação nos tempos de migração.

Autilização da concentração de 100 mmol/L de TEA (corrente de 69,6 uA), tensão de +30 kV e temperatura de 25ºC, também permitiu separação dos compostos de interesse, porém, como também observado para a concentração de 75 mmol/L de TEA, a utilização de BGEs com valores de concentração elevados podem ter a formação de um gradiente de temperatura (efeito Joule), o que prejudica a utilização da mesma solução de BGE para várias corridas.

Já a utilização da solução de TEA na concentração de 15 mmol/L (corrente de 14,4 uA), tensão de +30 kV e temperatura de 25ºC, não resultou na separação adequada dos compostos de interesse.



Parâmetros	DEO	OXY
Tempo de migração	7,315	7,564
Simetria	0,357	0,223
Cauda	2,697	3,250
Resolução	2,368	

Parâmetros	DEO	OXY
Tempo de migração	8,180	8,506
Simetria	0,483	0,494
Cauda	1,656	1,628
Resolução	3,320	

Parâmetros	DEO	OXY
Tempo de migração	8,301	8,641
Simetria	0,586	0,597
Cauda	1,415	1,435
Resolução	3,497	

Figura 11- Eletroferograma referente à análise da OXY e DEO em diferentes concentrações de TEA pH 3. Condições eletroforéticas: capilar de 45 cm de comprimento total e 50 µm de diâmetro interno; temperatura: 25ºC; tensão: +30 kV; injeção: 50 mbar por 20 segundos; detecção: 204 nm.

4.1.4. Tensão aplicada

Este parâmetro afeta a velocidade de migração, podendo ser utilizado para reduzir o tempo de análise. Um menor tempo de migração tem menor difusão dos analitos, e, portanto, menor alargamento do pico, o que resulta em maior eficiência. Porém, quando a tensão aplicada gera altas correntes e a dissipação do calor gerado éinadequada, a perda da resolução pode ocorrer (WEINBERGER, 2000).

Quando foi utilizada a solução de TEA 50 mmol/L, e a análise ocorreu na temperatura de 25ºC e tensão de +30 kV, a corrente obtida foi de 51 uA e o T_m foi de 8,18 minutos para a DEO e 8,51 minutos para a OXY. A corrente gerada foi considerada adequada para a realização das análises, pois não foi observada a perda de resolução por problemas de dissipação do calor quando realizadas cinco análises consecutivas (resolução superior a três).

4.1.5. Temperatura de análise

O controle da temperatura de análise é importante para assegurar a reprodutibilidade analítica (SHIHABI, 2004). A temperatura influencia fortemente tanto no volume de amostra injetada quanto no tempo de migração dos solutos, isto porque o aumento da temperatura diminui a viscosidade das soluções e aumenta as mobilidades eletroforéticas e eletrosmóticas, diminuindo o tempo de migração dos analitos, como pode ser observado na Figura 12 (PENG et al., 2009; WEINBERGER, 2000). O aumento da temperatura, portanto, pode ser utilizado como forma de acelerar a análise (WEINBERGER, 2000),porém pode causar o alargamento do pico, devido ao aumento do coeficiente de difusão,o que pode levar a diminuiçãoda resolução (EVENHUIS, C.J.; HADDAD, P.R., 2009; GRARD et al., 2000; KNOX; MCCORMACK, 1994; MUSHEEV; FILIPTSEV; KRYLOV, 2010). Por outro lado, temperaturas muito baixas podem levar a tempos de migração altos proporcionando o alargamento do pico, o que também afeta a resolução. As temperaturas de 30, 40 e 50ºC apresentaram tempos de migração adequados para as análises, com resolução entre a OXY e a DEO superiores a 1,5, porém, visando um compromisso entre os diversos fatores que podem afetar a análise (eletrólise do BGE, efeito Joule e simetria dos picos) foi selecionada a temperatura de 30 ºC.

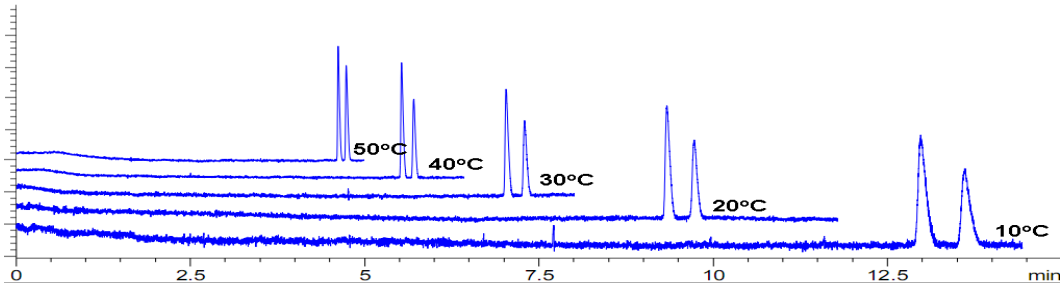


Figura 12 -Eletroferogramas referentes à análise da OXY e DEO em diferentes temperaturas. Condições eletroforéticas: capilar de 45 cm de comprimento total e 50 µm de diâmetro interno; solução de eletrólito: TEA 50 mM, pH 3,0; tensão: +30 kV; injeção: 50 mbar por 20 segundos; detecção: 204 nm.

4.1.6. Seleção do padrão interno

A padronização interna é normalmente o método de escolha para a análise de matrizes biológicas. O padrão interno é um composto quimicamente estável, geralmente com estrutura similar a do analito, que é adicionado às amostras em concentrações fixas e constantes para facilitar a quantificação do analito (CASSIANO et al., 2009).

Foram avaliados como IS a amiodarona, o haloperidol, a risperidona e a lidocaína. A amiodarona apresentou tempo de migração superior ao dos compostos de interesse, o que dificulta sua utilização, por aumentar o tempo de análise. O haloperidol apresentou tempo de migração semelhante a um dos compostos de interesse,o que o torna inadequado para a utilização como IS. A lidocaína e a risperidona apresentaram tempo de migração inferior ao da OXY e DEO. Entretanto, a lidocaína foi selecionada como IS por apresentar valores de pKa (8,53 e 14,23) semelhantes aos da OXY e da DEO e log P (2,35) que permite sua extração por solventes orgânicos. Seu tempo de migração médio (n = 30) foi de 5,38 minutos.

4.1.7. Eletrólise do eletrólito de corrida

A CE não é uma técnica robusta com relação à composição do BGE (MAYER, 2001). Pequenas mudanças no pH podem ter grande impacto na reprodutibilidade e precisão (KELLY; ALTRIA; CLARK, 1997).

Durante as análises, devido à aplicação de voltagem nas soluções de eletrólitos, pode ocorrer um fenômeno denominado depleção do BGE. Isso ocorre porque a aplicação de tensão resulta na eletrólise da água, com produção de prótons no ânodo e de ânions no cátodo (KELLY; ALTRIA; CLARK, 1997; WEINBERGER, 2000). Com o aumento do tempo de análise, a solução no reservatório do ânodo vai aumentando sua acidez, enquanto que a

solução no reservatório do cátodo torna-se cada vez mais alcalina (KELLY; ALTRIA; CLARK, 1997; POOLE, 2003), resultando em um gradiente de pH no capilar devido a fatores como difusão, convecção e migração de íons capazes de alterar o pH (MACKA; ANDERSSON; HADDAD, 1998).

Como o pH é o principal parâmetro experimental em CE, a eletrólise deve ser controlada utilizando-se BGE apropriado e realizando a sua troca entre as análises com frequência adequada para que tanto os tempos de migração quanto a resolução não sejam afetados por este fenômeno (MAYER, 2001; WEINBERGER, 2000). Também é necessária atenção prévia quanto à capacidade tamponante, concentração e força iônica do BGE e com relação ao volume dos reservatórios, temperatura utilizada, corrente gerada e tempo total de corrida (BONATO; de GAITANI; JABOR, 2009; MAYER, 2001; ZHU; HU; LIU, 2006).

Para evitar efeitos resultantes da depleção do BGE, foi avaliada a quantidade de análises que poderiam ser realizadas com um mesmo volume de BGE. Dez análises consecutivas foram realizadas utilizando-se a mesma solução. Variações nos tempos de migração e nas áreas obtidas para a OXY, a DEO e o IS foram analisadas através do cálculo do coeficiente de variação entre as corridas.

A CE apresenta baixa precisão em relação ao T_m (BLANCO-HERAS et al., 2007). Em experimentos realizados por Kelly, Altria e Clark (1997) com relação a alternativas para diminuir o efeito de eletrólise, foi admitido um valor de CV $\leq$ 3,5 para a utilização de um mesmo BGE para várias corridas. Como mostra a Tabela 9, não foram observadasdiferenças significativas nos tempos de migração (CV $\leq$ 0,6%) quando a mesma solução de BGEfoi utilizada em cinco análises consecutivas, de modo que o valor de 5 corridas eletroforéticas foi selecionado como limite para a troca do BGE, a fim de garantir a reprodutibilidade das análises.

Tabela 9 -Análise da influência da eletrólise do BGE nos parâmetros eletroforéticos

Parâmetros	**IS**	**OXY**	**DEO**
Analito	**CV (%)**	**CV (%)**	**CV (%)**
Área[a]	0,7	3,3	1,7
Tempo de migração (min) [a]	0,4	0,6	0,5

[a]Valores de 5 replicatas
CV (%), coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

4.1.8. Condições de separação otimizadas

Um capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno, não revestido foi utilizado para todos os testes de otimização realizados. O comprimento total do capilar foi de 45 cm e a distância para a migração dos analitos até a região de detecção foi de 36,5 cm. A eficiência de separação em CE é diretamente proporcional ao comprimento do capilar, porém o uso de capilares longos pode acarretar em análises lentas e difusão dos analitos, o que diminui a detectabilidade do método. Logo, se maior tempo é desprendido na otimização das análises, menores capilares podem ser empregados, com benefícios (WEINBERGER, 2000).

Normalmente, tempos de injeção da ordem de um a vinte segundos são utilizados (ALTRIA, 1996). Para o método otimizado, foi adotada injeção hidrodinâmica 50 mbar por tempo de 20 segundos. A injeção hidrodinâmica é mais precisa e robusta que a injeção eletrocinética (MAYER, 2001; TAVARES, 1996) e é indicada para amostras que possam variar em composição e condutividade (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; MAYER, 2001). O uso de maior tempo de injeçãono modo hidrodinâmicoaumenta a quantidade de amostra introduzida no capilarmelhorando assim, a capacidade de detecção(ALTRIA, 1996).

Durante todas as análises realizadas foi utilizada a área dos analitos para quantificação, já que este é um parâmetro que sofre menos alteração pela distorção dos picos produzida por altas concentrações do analito. Além disso, a utilização da área ao invés da altura, fornece maior intervalo de linearidade (BONATO; de GAITANI; JABOR, 2009; MAYER, 2001)emaior precisão entre os valores (HANSEN, 1999).

Após a avaliação da influência da temperatura, da concentração e pH da solução de BGE e da tensãoutilizada na análise da OXY e DEO, as condições analíticas foram estabelecidas e estão apresentadas na Tabela 10. A Figura 13 mostra o eletroferograma obtido nestas condições.

As análises apresentaram tempo médio de migração (n = 30) de 7,42 minutos para a OXY e de 7,12 minutos para a DEO, com resolução de 3,1 entre os picos.

Tabela 10 -Condições otimizadas para análise da OXY e da DEO por CE

Capilar	Sílica fundida com 45 cm de comprimento total, 36,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm de diâmetro interno
Eletrólito de corrida	TEA 50 mmol/L, pH 3
Injeção	Hidrodinâmica (20 segundos a 50 mbar)
Tensão	30 kV
Temperatura	30 °C
Comprimento de onda	204 nm
Condicionamento	NaOH 0,1 mol/L por 2 minutos; água ultra-pura por 2 minutos, BGE por 3 minutos e tensão de +30 kV por 2 minutos.

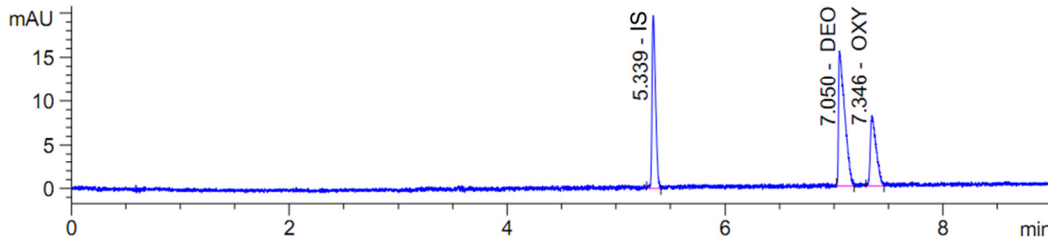


Figura 13 - Eletroferograma referente à análise da OXY, da DEO e do IS. Condições eletroforéticas descritas na Tabela 10.

4.2. Desenvolvimento do método para análise da OXY e da DEO em urina por DLLME

4.2.1. Características da matriz

Quando a concentração do analito é alta o suficiente, pequenas quantidades da amostra biológica como plasma, urina ou soro podem ser injetadas diretamente no capilar. Contudo, matrizes de alta força iônica podem causar o alargamento de banda e as proteínas podem ser adsorvidas pelas paredes do capilar, afetando a reprodutibilidade das análises. Para evitar estes problemas e para obter a detecção de analitos presentes em concentrações da ordem de ng/mL, algum tipo de preparo da amostra normalmente é utilizado (BONATO; de GAITANI; JABOR, 2009).

A DLLME é uma técnica de extração simples e rápida (OJEDA; ROJAS, 2009) que tem sido utilizada para preparo de diferentes matrizes (REZAEE, YAMINI, FARAJI, 2010).

Em alguns artigos descritos na literatura,para a realização na extração por DLLME,a urina foi diluída com a finalidade de diminuir o efeito de matriz (MASHAYEKHI et al., 2010; REZAEE et al., 2010; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011; SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011), o que torna o método aplicável apenas para amostras com alta concentração dos analitos (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Xiong et al. (2009) compararam a extração de amitriptilina, clomipramina e tioridazina por DLLME em três diferentes amostras: urina, urina diluída e água com o objetivo de verificar a habilidade da técnica de resistir às interferências da matriz e não observaram diferenças nos sinais analíticos obtidos nas extrações a partir das três matrizes analisadas. Desde modo, no presente trabalho foram utilizadas amostras de urina sem diluição, com o intuito de realizar a quantificação de menores concentrações de OXY e DEO na urina.

4.2.2. Seleção do solvente extrator

A seleção do solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante desta técnica de extração (CALDAS et al., 2011; ZANG et al., 2009). O solvente deve possuir como características: ser imiscível na amostra, ter maior densidade que esta e possuir alta capacidade de extração do composto de interesse (MELWANKI et al., 2009; ZANG et al., 2009). Os solventes extratores avaliados foram: tetracloroetileno(C_2Cl_4), tetracloreto de carbono (CCl_4), diclorometano (CH_2Cl_2), clorofórmio ($CHCl_3$), clorobenzeno (C_6H_5Cl), acetato de hexila ($C_8H_{16}O_2$) e dissulfeto de carbono (CS_2). Entre estes solventes oacetato de hexila não foi adequado para a extração por apresentar alta solubilidade na amostra, não havendo separação de fases após centrifugação. O diclorometano forneceu um baixo volume de fase sedimentada, inferior a 50 µL, provavelmente devido a sua alta solubilidade em água (13,8 g/L), de modo que foi descartado e o dissulfeto de carbono também não foi adequado porque ser imiscível em acetonitrila.

Em relação aos outros quatro solventes avaliados, o C_6H_5Cl apresentou baixa extração da OXY e da DEO (Figura 14). $OCCl_4$foi o solvente extrator que promoveu a maior recuperação dos compostos de interesse, além de apresentar menor desvio padrãoentre os resultados obtidos e, por isso, foi selecionado como solvente extrator. De acordo com Caldas, Costa e Primel (2010) que também utilizaram CCl_4, a extração dos compostos é favorecida por uma certa solubilidade em água (0,80 g/L) associada a alta densidade do solvente (1,59 g/L). O C_2Cl_4 e $CHCl_3$apesar de também serem capazes de extrair a OXY e a DEO, não

apresentaram a eficiência que o CCl_4obteve no processo de interação e extração dos analitos de interesse.

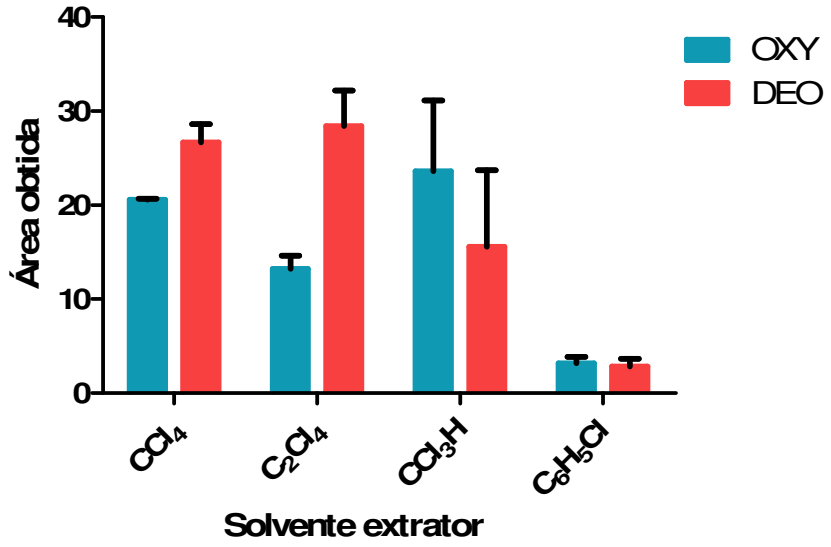


Figura 14 -Solvente extrator para a extração da OXY e da DEO por DLLME.

4.2.3. Seleção do solvente dispersor

A seleção apropriada do solvente dispersor pode promover a dispersãodo solvente extrator na forma de pequenas gotículas na amostra, causando o aumento da área superficial de contato para a transferência dos analitos de interesse da matriz para o solvente extrator (YAN et al, 2011).

Foram avaliados os solventes dispersores:acetonitrila (C_2H_3N), metanol (CH_4O), etanol (C_2H_6O) e acetona (C_3H_6O). Com exceção do metanol, os demais solventes dispersores avaliados apresentaram semelhança na recuperação dos analitos (Figura 15). Assim, com base no valor de área obtida bem como no desvio padrão entre as extrações, a acetonitrila foi o solvente dispersor escolhido.Essa combinação de CCl_4 e C_2H_3N como solvente extrator e dispersor, respectivamente, também foi utilizada nos trabalhos de Caldas, Costa e Primel (2010), Cheng et al. (2009) e Xiong et al. (2009).

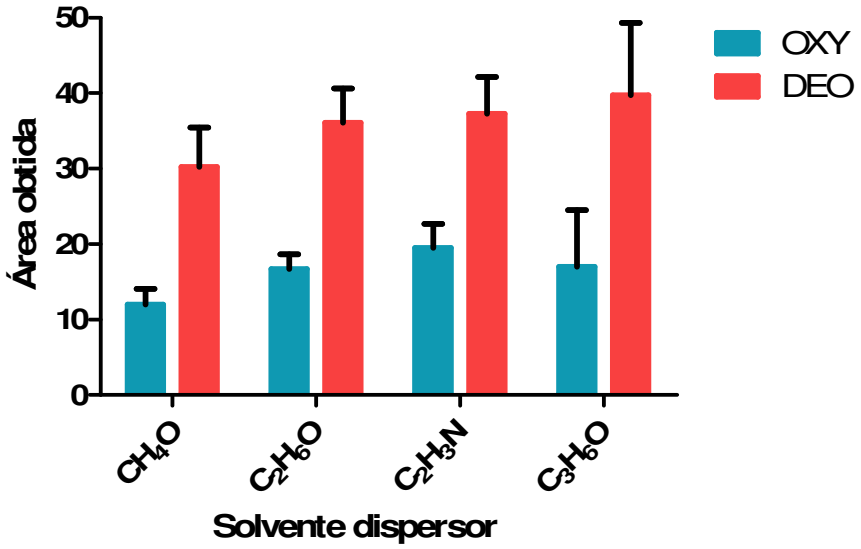


Figura 15-Solvente dispersor para a extração da OXY e da DEO por DLLME.

4.2.4. Influência do volume de solvente extrator

Pequenos volumes de solvente extrator levam a formação de pequenos volumes de fase sedimentada, o que pode afetar a reprodutibilidade. Além disso, a formação de um sólido lipídico branco entre a fase aquosa e orgânica, provavelmente pela precipitação de ácido úrico e carbamato em altos valores de pH (CHEN et al., 2011; XIONG et al., 2009) dificulta a recuperação do solvente extrator do fundo do tubo, como também foi observado por Saraji,Boroujeni e Bidgoli(2011) e prejudica a reprodutibilidade do método de extração (CUNHA; FERNANDES, 2010). Por isso, optou-se por realizar testes com volumes maiores de solvente extrator (80-140 µL), sendo que a recuperação foi maior quando foi utilizado 140 µL de tetracloreto de carbono, como pode ser observado na Figura 16.

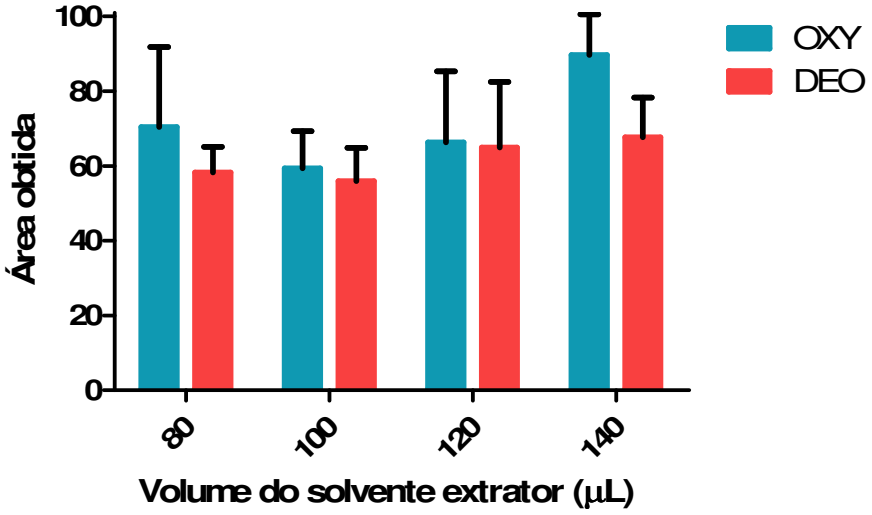


Figura 16 –Efeito do volume do solvente extrator para a extração da OXY e da DEO por DLLME.

Também foi constatado que quanto maior o volume de solvente extrator utilizado, maior o volume da fase sedimentada (Figura 17), como também foi observado por Daneshfar, Khezeli e Lotfi (2009) e Rezaee et al. (2006). Este aumento do volume de fase sedimentada promove a diminuição do fator de enriquecimento obtido, já que de acordo com a Equação 4, estes fatores são inversamente proporcionais.

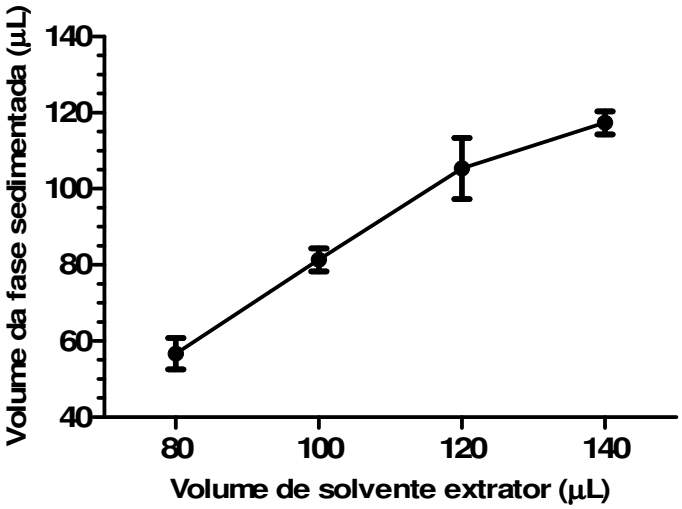


Figura 17 – Efeito do volume de solvente extrator no volume de fase sedimentada.

4.2.5. Influência do volume de solvente dispersor

Foram avaliados os volumes de 260, 360, 560 e 860 µL de solvente dispersor e foi observado que o aumento do volume de solvente dispersor não promoveu um aumento na recuperação da DEO. Além disso, o aumento do volume de solvente dispersor ocasionou uma diminuição da recuperação da OXY (Figura 18), portanto, o volume de 260 µLdo solvente dispersor acetonitrila foi escolhido para a DLLME. A menor recuperação da OXY pode ser explicada pelo aumento da solubilidade dos analitos na amostra quando um maior volume de solvente dispersor foi utilizado,o que diminui a partição dos mesmos para as gotículas do solvente extrator, diminuindo a eficiência da extração (YAN et al., 2011).

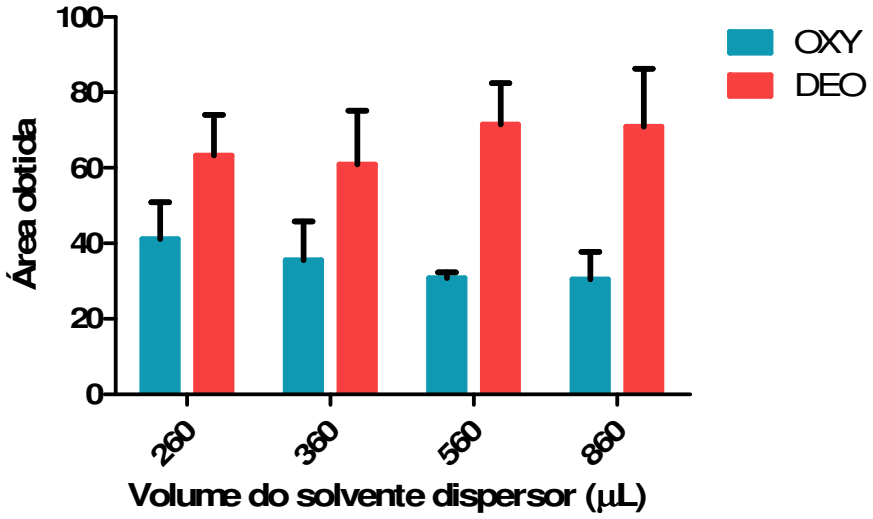


Figura 18 –Efeito do volume de solvente dispersor para a extração da OXY e da DEO por DLLME.

4.2.6. Influência do tempo de extração

Como citado anteriormente, em DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor e a centrifugação. Assim, foram avaliados os tempos 0, 2 e 5 minutos como tempo de extração e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os mesmosjá que o p foi superior ao valor limite de 0,05(p = 0,38),mostrando que o tempo não tem efeito na eficiência da extração (Figura 19). A grande área de contato entre o solvente extrator e a amostra, promovida pela presença do solvente dispersor, permite que a transferência de massa da fase aquosa para a fase extratora seja rápida e o estado de equilíbrio seja alcançado em um intervalo de tempo muito pequeno, o que torna a técnica independente do tempo e constitui

uma de suas grandes vantagens, como também foi observado por Berijani etal. (2006), Rezaei et al. (2008), Shamsipur e Fattahi(2011), entre outros. No entanto, tempo de extração de poucos segundos não assegura uma boa reprodutibilidade (MENG et al., 2011), portanto, foiselecionado o tempo de dois minutos para a extração.

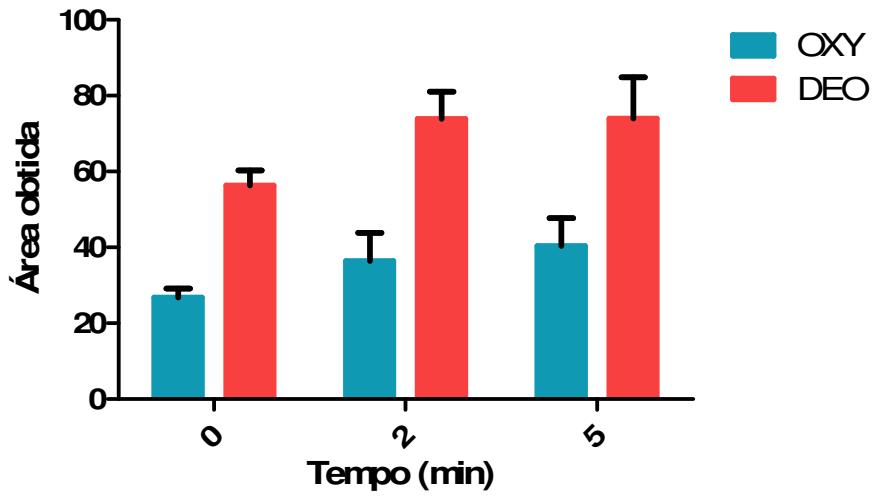


Figura 19 –Influência do tempo na extraçãoda OXY e da DEO por DLLME.

4.2.7. Influência do pH da amostra

O pH da amostra é um parâmetro essencial porque afeta tanto a eficiência como a seletividade da DLLME (MENG et al., 2011). Melwanki et al. (2009)observaramque a extração de analitos de amostras de urina sem convertê-los à forma molecular faz com que a eficiência da extração seja baixa.

Para que os analitos básicos fiquem não ionizados é necessário manter o pH da amostra acima do valor do pKa, aumentando assim, a tendência de serem extraídos pelo solvente extrator (SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011; XIONG et al., 2009). Por este motivo, foram avaliados os pHs 9, 10, 11 e 12. Os valores de pH que proporcionaram melhor extração dos compostos de interesse foram os pHs 11 e 12;como pode ser observado na Figura 20, sem diferença significativa entre as quantidades recuperadas, já que o valor de p é superior a 0,05 tanto para a OXY (p = 0,51) quanto para a DEO (p = 0,67).Contudo, para evitar uma possível degradação em pH 12, já que Miyamoto et al. (1994) relatou tempo de meia vida da OXY de 14 minutos para este pH, foi selecionado o pH 11.

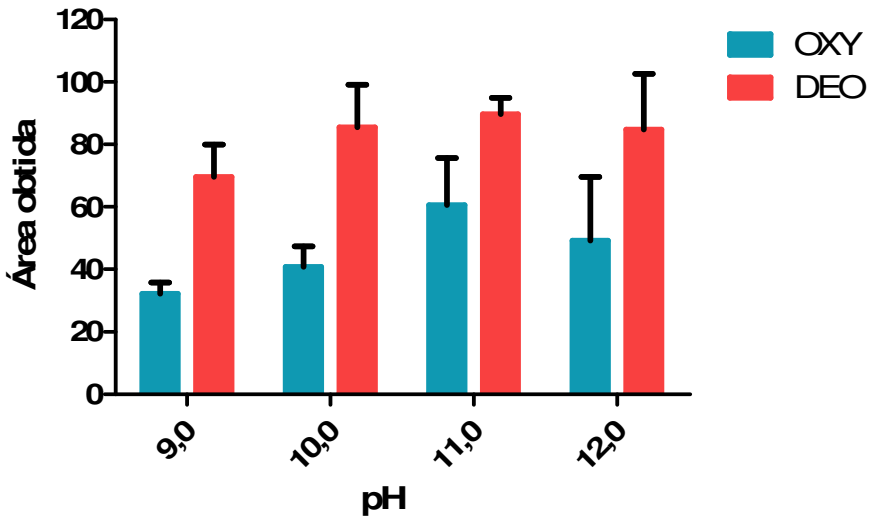


Figura 20 –Influência do pH da amostra na extração da OXY e da DEO por DLLME.

4.2.8. Influência da força iônica

A influência da força iônica foi avaliada pela adição de NaCl na urina, nas proporções de 2,5%, 5% e 10%. Pode ser observado na Figura 21 que 2,5 % de NaCl aumentou a eficiência da extração para a OXY e para a DEO.O aumento da eficiência de extração ocorreu provavelmente devido ao efeito "*salting out*", no qual moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor das moléculas do sal dissociadas, com consequente diminuição da concentração de água disponível para dissolver as moléculas do analito, levando ao aumento da transferência deste para o solvente orgânico (MELWANKI et al., 2009).

No entanto, em CE, a quantidade de íons presentes na amostra influencia significativamente a separação (SHIHABI, 2004) e amostras com alta quantidade de sal podem causar aquecimento da região em que se encontra a amostra no capilar e ocasionar a perda de qualidade do pico (SHAEPER, 2000).A possível ocorrência deste evento pode ter prejudicado a separação dos analitos quando a quantidade de NaCl adicionada foi de 5% e 10%, não sendo possível a quantificação da OXY e da DEO por CE com a utilização de 10% de NaCl. Deste modo, visando a concordância entre o aumento da eficiência de extração e a qualidade das análises por CE, foi selecionada a quantidade de 2,5% de NaCl para a extração.

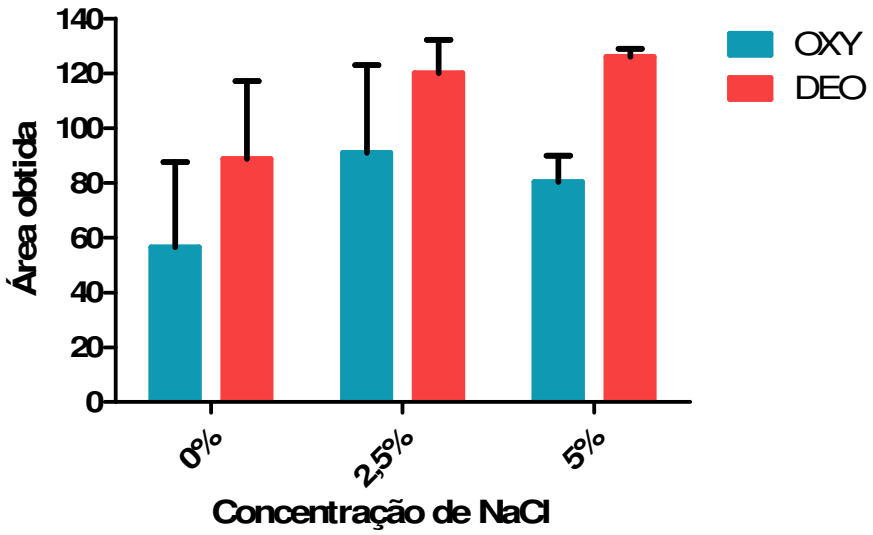


Figura 21– Influência da força iônica na extração da OXY e da DEO por DLLME.

4.2.9. Condições finais estabelecidas para a extração

Após a avaliação dos parâmetros descritos, as condições estabelecidas para a extração daOXY e DEO por DLLME estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11 –Condições estabelecidas para a realização da extração da OXY e da DEO por DLLME

Condições da DLLME para extração da OXY e da DEO da urina	
Solvente extrator	CCl_4
Solvente dispersor	C_2H_3N
Volume de amostra (mL)	5
Volume do solvente extrator (µL)	140
Volume do solvente dispersor (µL)	260
pH da amostra	11
% NaCl	2,5
Tempo de extração (min)	2
Tempo de centrifugação (min)	5
Velocidade de centrifugação (*g*)	2260
Volume coletado de solvente extrator (µL)	100

4.3. Validação do método

4.3.1. Conformidade do sistema

A precisão instrumental (conformidade do sistema) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas e sequenciais de uma mesma amostra. É determinada pela estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (RIBANI et al., 2004) e serve para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com precisão e exatidão aceitáveis. Para avaliar a conformidade do sistema, 50 µL de solução padrão de OXY e DEO, nas concentrações de 12µg/mL e 20µg/mL, respectivamente e 25 µL de solução padrão de lidocaína na concentração de 10 µg/mL foram transferidos para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os analitos foram redissolvidos em 50 µL de água ultra pura e transferidos para o frasco para injeção no aparelho de CE. Foram feitas dezanálises consecutivas a cada dia da validação (com a troca necessária do BGE) e foram observadas variações nos tempo de migração e nas áreas dos analitos.

A CE quando comparada ao HPLC, apresenta baixa precisão nos tempos de migração (BLANCO-HERAS et al., 2007) e na área dos analitos (HETTIARACHCHI; CHEUNG, 1995), sendo encontrados na literatura, valores de CV superiores a 1% para a área (HETTIARACHCHI; CHEUNG, 1995).

A variação do T_m é o resultado da soma da variação do EOF, da mobilidade do analito, da temperatura e da interação com a parede do capilar. Já a variação da área do pico é resultante de variações na injeção, difusão, temperatura, interação com a parede do capilar e da integração do pico (MAYER, 2001).

Para o método proposto, em relação ao tempo de migração dos analitos foram observados valores de CV < 2,1% tanto para a OXY quanto para a DEO.Em relaçãoaos valores de áreao CV< 5,0% para a OXY e o CV < 3,6% para a DEO.

A precisão em CE pode ser melhorada com a utilização de padronização interna e normalização de picos (HANSEN, 1999). Foi adotada a padronização interna, com a adoção do cálculo da razão entre as áreas dos picos da OXY e da DEO pela área obtida do IS, o que resultou em valores de áreas com CV < 3,5% para a OXY e CV < 2,6% para a DEO.

4.3.2. Seletividade

A seletividade de um método instrumental é a habilidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir em

sua determinação em uma amostra complexa, tipicamente metabólitos, impurezas, componentes da matriz e produtos de degradação (GONZALEZ; HERRADOR, 2007; PAI; DUBHASHI, 2010; RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2011). Nenhum composto presente na matriz deve apresentar o mesmo tempo de migração do analito de interesse e pelo menos seis fontes da matriz devem ser analisadas para garantir a seletividade do método (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2011).

Na validação deste método foi realizada a comparação das amostras de urina sem a presença dos analitos (seis amostras brancas) com amostras fortificadas com os analitos, ambas submetidas ao procedimento de extração por DLLME. Como pode ser observado na Figura 22, nas condições estabelecidas pelo método proposto, os componentes endógenos da matriz não influenciam a análise dos compostos de interesse e, portanto, o método tem seletividade para o objetivo proposto.

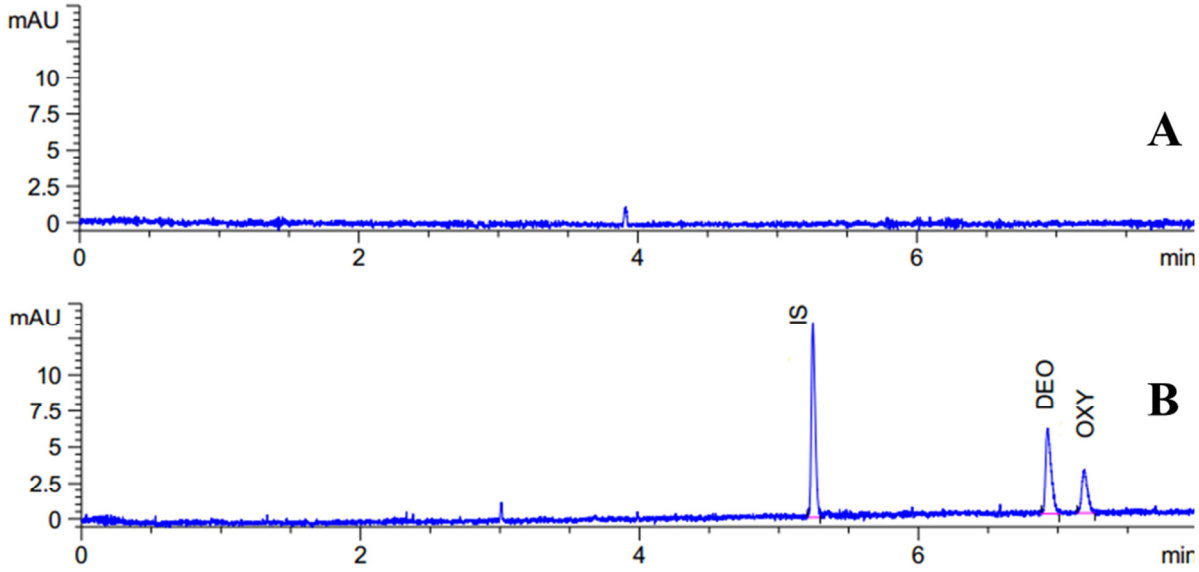


Figura 22 – Eletroferograma de amostras de urina após procedimento de extração por DLLME. Em A, urina sem adição dos analitos e em B urina fortificada com os padrões de OXY, DEO e IS.

4.3.3. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância, dentro de uma determinada faixa de aplicação (GUILHEN et al., 2010; RIBANI et al., 2004) e é determinada pela análise de amostras extraídas da matriz em pelo menos seis níveis de concentrações (ANVISA, 2003).

A curva de linearidade foi construída em sete níveis de concentração, tanto para a OXY quanto para a DEO, plotando no eixo das abscissas as concentrações dos analitos na urina e no eixo das ordenadasa razão entre as áreas do analito e padrão interno. Os coeficientes de correlação (r) obtidospara as retas atendem as normas estabelecidas pela ANVISA ($r \geq 0,98$) (Tabela 12) e representam o nível de erro em relação ao sinal analítico e a qualidade de ajuste da equação à curva de calibração (CASSIANO et al., 2009).

Porém,para demonstrar a linearidade não é adequado utilizar somente o valor do coeficiente de correlação, pois, mesmo quando se obtém valores de r próximos a um, é possível que a regressão não seja linear (CASSIANO et al., 2009; MILLER, 1991; RIBEIRO et al., 2008; SINGTOROJ et al., 2006) ou que o modelo de regressão linear não atenda a faixa de concentração estabelecida (CASSIANO et al., 2009).Sendo assim, também foi realizado o teste de ajuste do modelo linear pela aplicação do teste F de significância e pela observação do gráfico de resíduos (Figuras 23 e 24 e Tabela 12), cuja análise permite detectar problemas na curva como: desvio de linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedasticidade e dependência entre erros (RIBEIRO et al., 2008).

O valor de F experimental é expresso como a razão entre as variâncias obtidas no menor e maior nível de concentração da faixa de trabalho (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002; CASSIANO et al., 2009). Já o $F_{tabelado}$ foi obtido de uma tabela F com nível de confiança de 95 % para $f_1=f_2= (n-1)$ graus de liberdade.

Quandoo F experimentalé menor que o $F_{tabelado}$,a variância é constante em toda a faixa da curva de calibração, os resíduos ficam aleatoriamente distribuídos no eixo x, de modo queo ajuste do modelo é considerado satisfatório ea linearidade é aceita (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002; CASSIANO et al., 2009).

Nas curvas apresentadas os valores de F atendem as condições estabelecidas. Além disso, os valores de *p*são superiores a 0,05, o que também confirma a adequação dos resultados obtidos (Tabela 12). Deste modo, pode-se afirmar que o ajuste do modelo é considerado satisfatório.

Tabela 12 –Linearidade e teste do modelo linear para a OXY e a DEO

	OXY	**DEO**
Equação	y = 0,0062x – 0,1294	y = 0,0072x – 0,6093
r	0,9901	0,9981
Faixa linear	90-300 ng/mL	187,5-750 ng/mL
F	1,40	0,79
Valor de *p*	0,29	0,58

y = Ax + B, no qual y é a razão da área do analito (OXY ou DEO)/ área do padrão interno e x é a concentração do analito na urina (OXY ou DEO) em ng/mL
r = coeficiente de correlação
F = valor obtido no teste F de significância
$F_{tabelado}$ = 3,00 (PAGANO; GAUVREAU, 2004)
$p \leq 0,05$ é considerado como estatisticamente significante.

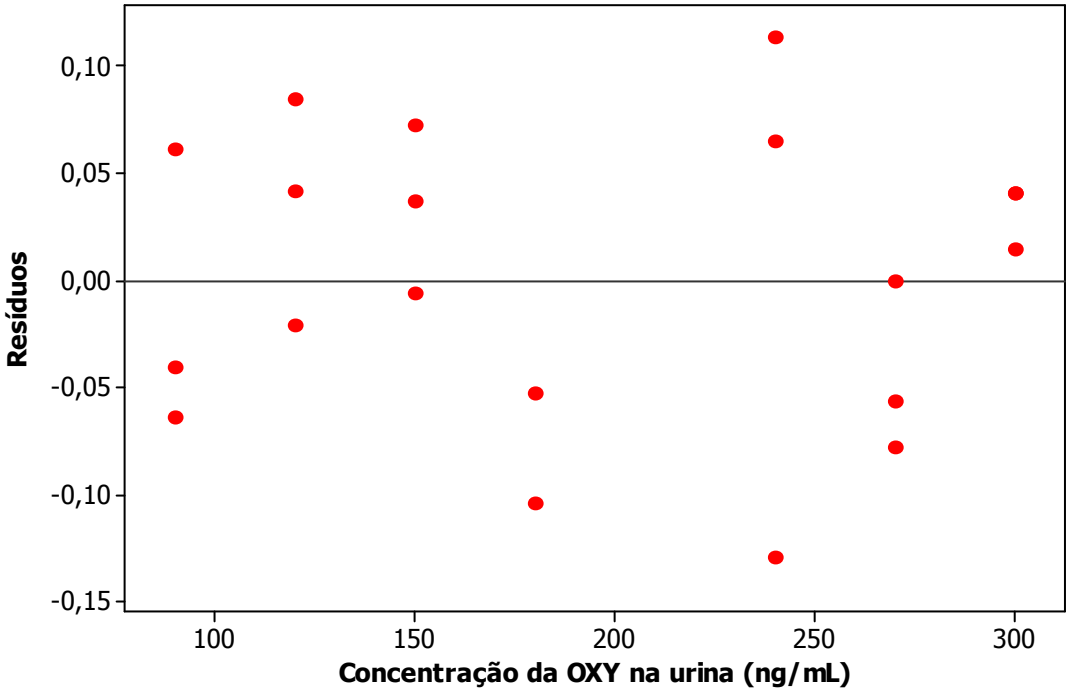


Figura 23–Gráfico de resíduos para OXY.

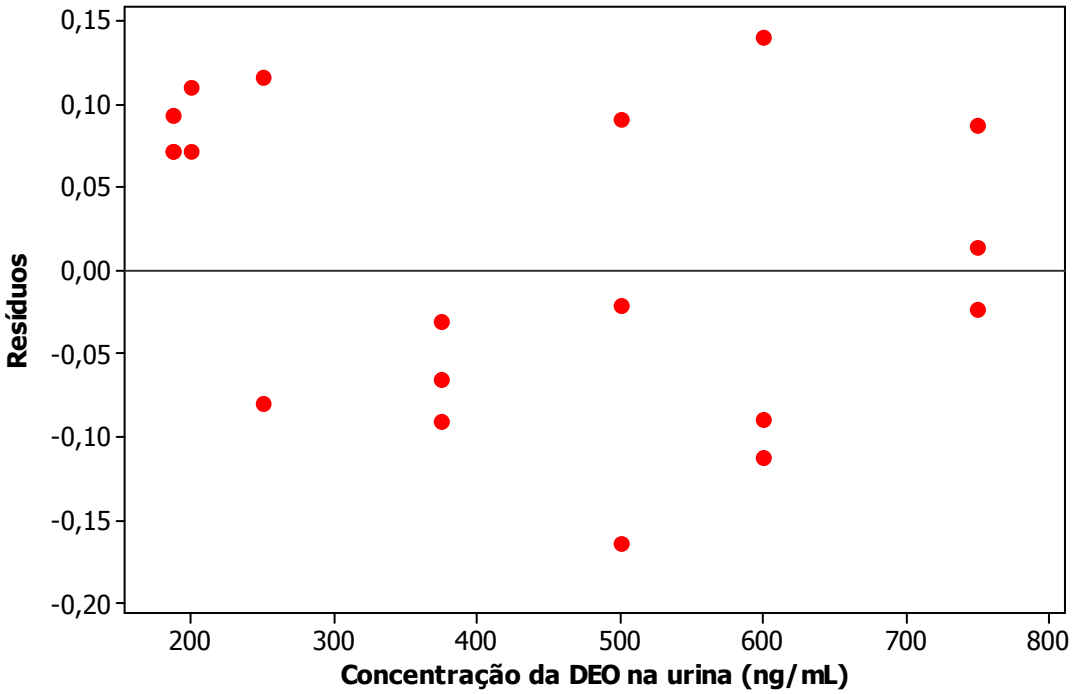


Figura 24–Gráfico de resíduos para DEO.

4.3.4. Limite de quantificação

A sensibilidade do método é determinada pelo limite de detecção e quantificação (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010), que são particularmente úteis quando o analito que se deseja mensurar está presente em quantidades muito baixas na amostra (GUILHEN et al., 2010).

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; GONZALEZ; HERRADOR, 2007; ROZET et al., 2011). É estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis e deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de migração do fármaco (ANVISA, 2003).

Para avaliar o limite de quantificação foram analisadas, em quintuplicata, amostras de urina fortificadas nas concentrações de 90 ng/mL para OXY e 187,5 ng/mL para a DEO. Os resultados de precisão e exatidão para estas concentrações estão representados na Tabela 13.Os valores estão de acordo com a literatura para métodos bioanalíticos, que admite valores de LIQ com exatidão e precisão inferiores a 20%(ANVISA, 2003; BERTHIER, 2004).

Tabela 13–Limite de quantificação do método para a análise da OXY e da DEO em urina

	OXY	DEO
Concentração nominal (ng/mL)	90	187,5
Concentração analisada (ng/mL)[a]	90,8	190,9
Precisão (CV, %)[b]	5,2	2,2
Exatidão[c](%)	0,9	1,8

[a]n = 5,n = número de replicatas
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c]Exatidão, expressa como a porcentagem de erro (%).

4.3.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010; PAI; DUBHASHI, 2010). É um parâmetro importante que possibilita decidir se o método analítico é confiável para o objetivo da análise (CASSIANO et al., 2009).

A precisão intradia foi avaliada pela realização de quintuplicatas em três níveis de concentração em um mesmo dia, enquanto que a precisão interdia foi avaliada pela realização de quintuplicata em três níveis de concentração em três dias diferentes. Como pode ser observado na Tabela 14, a precisão manteve-se dentro dos critérios recomendados na literatura (CV < 15%), tanto para a precisão intradia como para a precisão interdias (ANVISA, 2003).

Tabela 14 -Precisão intradia e interdias do método para a análise da OXY e da DEO em urina

	Dia	OXY			DEO		
Concentração nominal (ng/mL)		**120**	**180**	**300**	**200**	**500**	**750**
INTRADIA							
Concentração analisada (ng/mL)	Dia 1	113,7	182,8	278,9	193,6	507,4	745,0
	Dia 2	109,7	187,5	293,6	198,4	522,1	747,2
	Dia 3	118,3	175,4	313,7	197,1	515,8	718,1
Precisão (CV, %)[a]	Dia 1	7,7	12,2	10,4	7,9	10,1	5,8
	Dia 2	5,6	12,6	4,7	8,9	5,7	8,3
	Dia 3	5,5	10,0	11,5	3,0	6,9	3,4
INTERDIAS							
Concentração analisada (ng/mL)		113,9	181,9	295,4	196,4	505,1	737,0
Precisão (CV, %)[a]		6,7	11,2	10,1	6,7	7,3	6,0

[a] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

4.3.6. Exatidão

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2011). É determinada pelo enriquecimento de amostras branco com quantidades conhecidas do analito e comparação dos valores obtidos com os valores esperados (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010).

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e o valor de referência considerado como verdadeiro (RIBEIRO et al., 2008) e foi expressa como a porcentagem de erro em relação à concentração teórica. Para o cálculo da exatidão foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos de precisão intradia (quintuplicata em três concentrações em um mesmo dia) e nos estudos interdias (quintuplicata em três concentrações em três dias diferentes). Os erros, apresentados na Tabela 15, não excederam a 15%, de modo que os resultados estão de acordo com os critérios definidos pela resolução adotada para a validação do método (ANVISA, 2003).

Tabela 15 - Exatidão intradia e interdias do método para a análise da OXY e da DEO em urina

	Dia	**OXY**			**DEO**		
Concentração nominal (ng/mL)		**120**	**180**	**300**	**200**	**500**	**750**
INTRADIA							
Concentração analisada (ng/mL)	Dia 1	113,7	182,8	278,9	193,6	507,4	745,0
	Dia 2	109,7	187,5	293,6	198,4	522,1	747,2
	Dia 3	118,3	175,4	313,7	197,1	515,8	718,1
Exatidão (%)[a]	Dia 1	-5,2	1,6	-7,0	-3,2	1,5	0,7
	Dia 2	-8,6	4,2	-2,1	-0,8	4,4	-0,4
	Dia 3	-1,4	-2,6	4,6	-1,4	3,2	-4,2
INTERDIAS							
Concentração analisada (ng/mL)		113,9	181,9	295,4	196,4	505,1	737,0
Exatidão (%)[a]		-5,1	1,1	-1,5	-1,8	3,0	-1,7

[a]Exatidão, expressa como a porcentagem de erro (%).

4.3.7. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão internopróximas a 100% são desejáveis e melhoram a detectabilidade, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja reprodutiva, consistente e precisa (ANVISA, 2003; CASSIANO et al., 2009).

Os valores obtidos de recuperação são apresentados na Tabela 16, na qual estão descritas as recuperações da OXY e da DEO para cada nível de concentração bem como suas recuperações médias. Também são apresentadosna tabela, os valores de recuperação para o IS. Pode-se observar que, em todas as concentrações avaliadas, os coeficientes de variação foram inferiores a 10%.

Tabela 16-Recuperação do método para a OXY, a DEO e o IS em urina

	OXY			**DEO**			**IS**
Concentração nominal (ng/mL)	**120**	**180**	**300**	**200**	**500**	**75**	**5**
Recuperação (%)	75,4	66,3	72,5	56,4	60,6	65,6	65,4
(CV, %)[b]	4,0	4,5	0,9	3,1	1,9	9,6	4,6
Recuperação média (%)		71,4			60,9		65,4
(CV, %)[c]		6,4			8,5		4,6

[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem para cada concentração.
[c] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem entre as concentrações.

Já o EF foi calculado através da Equação 4 e para a OXY foi de 30,5 enquanto que para a DEO foi de 26,0. Valores semelhantes também foram obtidos por Melwanki et al. (2009) para a extração de 7-aminoflunitrazepam em amostras de urina.

4.3.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos e indica sua confiança durante o uso normal(ANVISA, 2003).

Parasua análise, vários parâmetros que podem sofrer pequenas variações durante a rotina de análise devem ser avaliados, como a concentração e o pH do BGE, a temperatura de análise e os ciclos de lavagem do capilar (BONATO; JABOR; de OLIVEIRA, 2010).

Neste trabalho, para avaliar a robustez do método, foi utilizado planejamento fatorial completo composto por três fatores,os quais foram estudados em dois níveis (máximo e mínimo). Os resultados obtidos estão representados pelo Gráfico de Pareto (Figura 25) e mostram a influência de cada fator (A = temperatura de análise, B = concentração do BGE e C = pH do BGE) na área e no T_m dos analitos (OXY, DEO e IS). A linha vertical representa o valor t-crítico para α = 0,05. Os efeitos menores que o valor de t-crítico são considerados como efeitos não significativos, enquanto que os valores que ultrapassam a linha vertical são considerados estatisticamente significativos. O método é robusto para quase todos os fatores

avaliados, porém, a variação do fator concentração do BGE e da combinação de fatores concentração e pH do BGE afetam a resposta área da OXY, de modo que são fatores que devem ser controlados com maior cuidado durante o preparo do BGE.

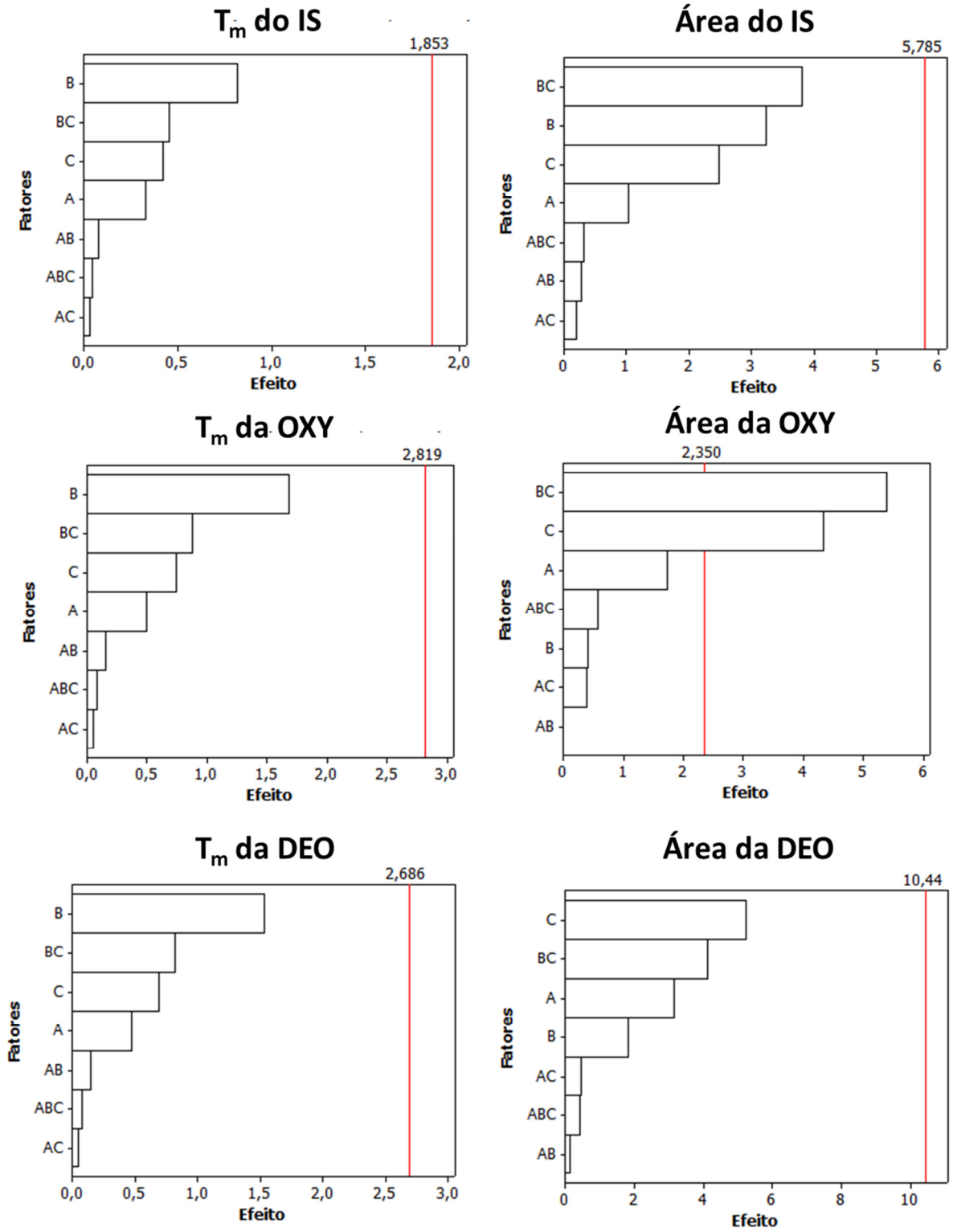


Figura 25 -Avaliação da robustez do método, representada pelo gráfico de Pareto, no qual A = temperatura da análise, B = concentração do BGE e C = pH do BGE.

4.3.9. Estudos de estabilidade do fármaco em fluidos biológicos

A estabilidade do fármaco em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento usado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (ANVISA,2003).

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Para isso, devem ser avaliadas: a estabilidade do analito nas condições de análise,após armazenagem de longa duração (congelamento) e de curta duração (à temperatura ambiente) e após ciclos de congelamento e descongelamento (ANVISA, 2003).

- ✓ **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Normalmente as amostras são congeladas e descongeladas para re-análises. Por esse motivo, a estabilidade dos analitos nas amostras biológicas deve ser analisada após no mínimo três ciclos de congelamento e descongelamento (CASSIANO et al., 2009).

Após a extração, foi realizada a comparação entre as concentrações das amostras que foram submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento com as concentrações das amostras recém-preparadas. Como pode ser constatado pelos valores de *p* obtidos ($p \geq 0,05$) e pelos valores de CV inferiores a 15% (Tabela 17), a OXY e a DEO mantiveram-se estáveis a ciclos de congelamento e descongelamento, pois não houve diferença significativa entre os resultados das amostras comparadas.

Tabela 17 -Estabilidade da OXY e da DEO em urina após ciclos de congelamento e descongelamento

Ciclo de congelamento e descongelamento[a]		**Concentração na urina (ng/mL)**			
		OXY		**DEO**	
		120	**300**	**200**	**750**
	Valor de *p*	0,32	0,76	0,16	0,78
	CV [b] (%)	14,1	3,4	3,4	3,2

[a] n = 6, n = número de replicatas, compreendendo as amostras frescas e do ciclo de congelamento e descongelamento
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

- ✓ **Estabilidade de curta duração**

A estabilidade do analito em matrizes biológicas é geralmente crítica, mesmo em curtos períodos de tempo e, portanto, é importante analisar a estabilidade dos compostos na

matriz em temperatura ambiente (estabilidade antes do processamento) para verificar a necessidade de condições especiais de preservação da amostra (HARTMANN et al., 1998). Quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por um período de 12 horas, não foi observada a degradação dos analitos, já que a comparação com amostras frescas também submetidas ao processo de extração obteve $p \geq 0,05$ (Tabela 18), o que significa que não há diferença significativa entre as amostras, ou seja, as amostras são estáveis quando mantidas a temperatura ambiente por um curto período de tempo. Os CVs também mantiveram-se em valores inferiores ao estabelecido pela literatura (CV < 15%).

Tabela 18 - Estabilidade de curta duração para OXY e DEO em amostras de urina

Estabilidade de curta duração[a]		**Concentração na urina (ng/mL)**			
		OXY		**DEO**	
		120	**300**	**200**	**750**
	Valor de *p*	0,31	0,13	0,66	0,60
	CV [b] (%)	7,0	11,7	10,6	3,3

[a] n = 6, n = número de replicatas, compreendendo as amostras frescas e da estabilidade de curta duração
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

✓ **Estabilidade de longa duração**

Alguns problemas podem ocorrer quando amostras biológicas são armazenadas por por longos períodos de tempo, como a adsorção dos analitos no recipiente ou degradação dos compostos de interesse, com consequente formação de metabólitos e outras substâncias (CASSIANO et al., 2009). Por esse motivo, a estabilidade de longa duração deve ser estabelecida. Neste estudo, amostras de urina fortificadas com OXY e DEO foram mantidas em freezer por um período de uma semana. Após este período as amostras foram descongeladas e submetidas ao processo de extração. As concentrações obtidas foram comparadas com os valores de amostras recém-preparadas.Os resultados, apresentados na Tabela 19, mostram que não há diferença significativa entre as amostras, uma vez que os valores de *p* são maiores que 0,05 para as duas concentrações analisadas.

Tabela 19 - Estabilidade de longa duração para OXY e DEO em amostras de urina

Estabilidade de longa duração[a]		**Concentração na urina (ng/mL)**			
		OXY		**DEO**	
		120	**300**	**200**	**750**
	Valor de *p*	0,06	0,83	0,59	0,78
	CV [b] (%)	12,1	12,5	9,6	13,5

[a] n = 6, n = número de replicatas, compreendendo as amostras frescas e da estabilidade de longa duração
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

✓ **Estabilidade pós-processamento**

Problemas de instabilidade podem ocorrer não somente na matriz biológica e durante o tratamento das amostras, como também nas amostras processadas. Assim, é necessário avaliar a estabilidade dos analitos no solvente em que foram reconstituídos e na temperatura em que permanecem antes das análises por tempo superior ao programado para completar todas as análises (CASSIANO et al, 2009). Os resultados,presentes na Tabela 20, mostram que não há diferença significativa entre as amostras, uma vez que os valores de *p* são maiores que 0,05 para as concentrações baixas e altas de OXY e DEO analisadas.

Tabela 20 - Estabilidade da OXY e da DEO pós-processamento

Estabilidade pós-processamento[a]		**Concentração na urina (ng/mL)**			
		OXY		**DEO**	
		120	**300**	**200**	**750**
	Valor de *p*	0,61	0,91	0,70	0,97
	CV [b] (%)	13,5	4,4	11,0	7,7

[a] n =10, n = número de replicatas, compreendendo as amostras recém processadas e após 24 horas de processamento
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível analisar a OXY e a DEO por eletroforese capilar, com tempo de migração de 7,42 e 7,12, respectivamente e separação entre os picos com resolução de 3,1.
- ✓ A técnica de DLLME utilizada para a extração da OXY e DEO em amostras de urina foi adequada e, de acordo com os parâmetros avaliados, a melhor condição para extração foi obtida com o uso de 140 µL de tetracloreto de carbono (solvente extrator) e 260 µL de acetonitrila (solvente dispersor) e tempo de extração de 2 minutos.
- ✓ As características de desempenho analítico avaliadas apresentaram resultados satisfatórios e de acordo com a legislação vigente.

Portanto, foi possível desenvolver um método rápido, fácil e confiável para analisar e quantificar a OXY e a DEO em amostras de urina por eletroforese capilar usando a DLLME como técnica de preparo de amostra.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAMS, P.; ANDERSSON, K. Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder. **British Journal of UrologyInternational**, Oxon, v. 100, n. 5, p. 987-1006, 2007.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B,** Amsterdam, v.774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ALTRIA, K.D. **Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: Humana Press, 1996. 349 p.

ALTRIA, K.D.; KELLY, M.A.; CLARK, B.J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis I. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 204-214, 1998.

ANASTOS, N.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 269-279, 2005.

ANDERSSON, K.E.; CHAPPLE, C.R. Oxybutynin and the overactive bladder. **World Journal of Urology,** New York, v. 19, n. 5, p. 319-323, 2001.

ARISCO, A.M.; BRANTLY, E.K.; KRAUS, S.R. Oxybutynin extended release for the management of overactive bladder: a clinical review.**Drug Design Development and Therapy,** Auckland, v. 3,p. 151-161, 2009.

ASSUNÇÃO, N.A. et al. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.

BERIJANI, S. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection - very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1123, n. 1, p. 1-9, 2006.

BERTHIER, S. Validation of bioanalytical methods. In: HEMPEL, G. **Handbook of Analytical Separations**, v. 5. Oxford: Elsevier, 2004. Cap. 5, p. 113-128.

BIRNS, J. et al. A randomized controlled trial comparing the efficacy of controlled-release oxybutynin tablets (10 mg once daily) with conventional oxybutynin tablets (5 mg twice daily) in patients whose symptoms were stabilized on 5 mg twice daily of oxybutynin.**British Journal of UrologyInternational**, Massachusetts, v. 85, n. 7, p. 793-798, 2000.

BLANCO-HERAS, G.A. et al. Capillary electrophoretic method for the determination of inorganic and organic anions in real samples - Strategies for improving repeatability and reproducibility.**Journal of Chromatography A**,Amsterdam, v. 1144, n. 2, p. 275-278, 2007.

BOER, T. et al. Selectivity in capillary electrokinetic separations. **Electrophoresis,** Berlin, v. 20, n. 15-16, p. 2989-3010, 1999.

BONATO P.S.; JABOR, V.A.P.; de OLIVEIRA, A.R.M. Analysis of chiral drugs in body fluids. In: EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis.** Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 12, p. 341-361.

BONATO, P.S.; de GAITANI, C.M.; JABOR, V.A.P. Drugs in body fluids: analysis by capillary electrophoresis. In: CAZES, J. **Encyclopedia of Chromatography**. 3ª Ed. London: Taylor & Francis, 2009, p. 277-282.

BONATO, P.S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BOONE, C.M. et al. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs-a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Kidlington, v. 20, n. 6, p. 831-863, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analiticos e bioanalíticos.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

CALDAS, S.S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova,** São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 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,** Amsterdam,v. 665, n. 1, p. 55-62, 2010.

CASSIANO, N.M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova,** São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHEN, J. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of clozapine and chlorpromazine in urine.**Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences**, New York, v. 31, n. 2, p. 277-284, 2011.

CHENG, J. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 90, n. 11, p. 845-855, 2009.

COMAR, J.F.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; BRACHT, A. The action of oxybutynin on haemodynamics, and metabolism in the perfused rat liver.**Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 93, n. 3, p. 147-152, 2003.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.A. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS).**Talanta**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 117-125, 2010.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H.J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, n. 4, p. 456-460, 2009.

ERDEM, N.; CHU, F. M. Management of overactive bladder and urge urinary incontinence in the elderly patient. **The American Journal of Medicine,** New York, v.119, n. 3, p. 29S-36S, 2006.

EVENHUIS, P.R.; HADDAD,P. R. Joule heating effects and the experimentaldetermination of temperature during CE.**Electrophoresis**,Weinheim, v. 30, n. 5,p. 897-909, 2009.

FAKHARI, A.R. et al. Development of a stability-indicating CE assay for the determination of amlodipine enantiomers in commercial tablets.**Electrophoresis**,Weinheim, v. 29, n. 22, p. 4583-4592, 2008.

FARAJZADEH, M.A.; DJOZAN, Dj.; BAKHTIYARI, R.F. Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid–liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography- flame ionization detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, n. 4-5, p. 1360-1367, 2010.

FEKETE, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Capillary Electrophoresis. In: PICÓ, Y. **Food toxicants analysis**. 1 ª Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. Cap. 15, p. 561-597.

FONSECA, P. et al. Enantioselective analysis of oxybutynin and N-desethyloxybutynin with application to an in vitro biotransformation study. **Journal of ChromatographyB**, Amsterdam, v. 875, n. 1, p. 161-167, 2008.

GIANNINI, I. et al. Cyclodextrin-MEEKC for the analysis of oxybutynin and its impurities. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 781-788, 2009.

GOLDENBERG, M.M. An extended-release formulation of oxybutynin chloride for the treatment of overactive urinary bladder. **Clinical Therapeutics**, New York, v. 21, n. 4, p. 634-642, 1999.

GONZALEZ, A.G; HERRADOR, M.A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles.**Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GRAEF, L.E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GRARD, S. et al. Enhancement of second-migrating enantiomer peak symmetry of basic drugs by using dual-cyclodextrin system in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Berlin, v. 21, n. 14, p. 3028-3034, 2000.

GUAY, D.R.P. Clinical pharmacokinetics of drugs used to treat urge incontinence. **Clinical Pharmacokinetics,** Oakland, v. 42, n. 14, p. 1243-1285, 2003.

GUILHEN, S.N. et al. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). Estudo de caso. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1285-1290, 2010.

GULUR, D.M.; DRAKE, M. J. Management of overactive bladder. **Nature Reviews Urology,** New York,v.7, n. 10, p. 572-582, 2010.

HANSEN, H.K. et al.Comparison of high-performance liquid chromatography and capillaryelectrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinicacid in pharmaceutical preparations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsnterdam, v. 9, n. 1,p. 41-46, 1999.

HARRIS, D.C. Métodos cromatográficos e eletroforese capilar. In: _____. **Análise Química Quantitativa**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2008. Cap. 26, p. 663-674.

HARTMANN, C. et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** Oxford, v. 17, n. 2, p. 193-218, 1998.

HARVEY, D. Chromatographic and eletrophoretic methods. In: _____. **Modern Analytical Chemistry.** 1ª Ed. Boston: McGraw-Hill, 2000. Cap. 12, p. 597-609.

HETTIARACHCHI, K.; CHEUNG, A. P. Precision in capillary electrophoresis with respect to quantitative analysis of suramin.**Journal of Chromatography A**,v. 717, n.1-2, p. 191-202, 1995.

HUGHES, K.M. et al. Measurement of oxybutynin and its N-desethyl metabolite in plasma, and its application to pharmacokinetic stydies in young, elderly and frail elderly volunteers. **Xenobiotica**, London, v. 22, n. 7, p. 859-869, 1992.

HUO, X. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 2011.

ISSAQ, H.J. A decade of capillary electrophoresis - Review. **Electrophoresis,** Berlin, v. 21, n. 10, p. 1921-1939, 2000.

JAGER, A.V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações.**Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

KELLY, M.A.; ALTRIA, K.D.; CLARK, B.J. Approaches used in the reduction of buffer electrolysis effects for routine capillary electrophoresis procedures in pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A,**Amsterdam, v. 768, n. 1, p. 73-80, 1997.

KIM, H.; HAN, S.B. Sensitive determination of oxybutynin and desethyloxybutynin in dog plasma by LC/ESI/MS/MS.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Oxford, v. 31, n. 2, p. 341-349, 2003.

KNOX, J.H.; MCCORMACK, K.A. Temperature effects in capillary electrophoresis. 1: internal capillary temperature and effect upon performance. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 38, n. 3-4, p. 207-214, 1994.

KOCÚROVÁ, L. et al. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 102, p. 11-17, 2012.

KOLBAH, T.A.; ZAVITSANOS, P. Chiral bioanalysis by normal phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 759, n. 1-2, p. 65-77, 1997.

KONTANI, H. et al. Comparison of the effects of percutaneous and intraduodenal administration of oxybutynin on bladder contraction and salivation in rabbits. **International Journal of Urology**, Oxon, v. 13, n. 7, p. 977-984, 2006.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S., **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice**. 1ª Ed. Berlin: Springer Laboratory, 1993.

LABORATOIRE SUISSE D'ANALYSE DU DOPAGE. **Zone capillary electrophoresis principle.**2008. Disponível em: <www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm>. Acesso em: 20 Jul. 2011.

LIANG, P.; SANG, H. Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 380, n. 1, p. 21-25, 2008.

LILI, L. et al. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 16, p. 2365-2370, 2010.

LURIE, I.S.; HAYS, P.A.; PARKER, K. Capillary electrophoresis analysis of a wide variety of seized drugs using the same capillary with dynamic coatings. **Electrophoresis,** Weinheim, v. 25, n. 10-11, p. 1580-1591, 2004.

MACDIARMID, S.A. Maximizing anticholinergic therapy for overactive bladder: has the ceiling been reached? **British Journal of Urology**, Oxon, v. 99, n. 3, p. 8-12, 2007.

MACKA, M.; ANDERSSON, P.; HADDAD, P.R. Changes in electrolyte ph due to electrolysisduring capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**,Washington, v. 70, n. 4, p. 743-749, 1998.

MASHAYEKHI, H.A. et al. Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC.**Chromatographia**, Heidelberg, v. 71, n. 5-6, p. 517-521, 2010.

MASSOUD, R. et al. Extraction and determination of oxybutynin in human bladder samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B,** Amsterdam, v. 734, n. 1, p. 163-167, 1999.

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

MELWANKI, M.B. et al. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta,** Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 618-622, 2009.

MENG, L. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International,** Clare, v. 209, n. 1-3, p. 42-47, 2011.

MICHEL, M.C.; HEDGE, S.S. Treatment of the overactive bladder syndrome with muscarinic receptor antagonists - a matter of metabolites? **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,** New York, v. 374, n. 2, p. 79-85, 2006.

MILLER, J.N. Basic statistical methods for analytical chemistry part 2. Calibration and regression methods* A review. **Analyst,** Cambridge, v.116, n. 1, p. 3-14, 1991.

MIYAMOTO, E. et al. High-performance liquid chromatographic preparation of oxybutynin enantiomers on a chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 653, n. 1, p. 135-137, 1993.

MIYAMOTO, E. et al. Physicochemical properties of oxybutynin. **Analyst**, Cambridge, v. 119, n. 7, p.1489-1492, 1994.

MIZUSHIMA, H. et al. Stereoselective pharmacokinetics of oxybutynin and N-desethyloxybutynin in vitro and in vivo. **Xenobiotica**, Oxon, v. 37, n. 1, p. 59-73, 2007a.

MIZUSHIMA, H. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics analysis of the relationship between the in vivo micturition pressure and receptor occupancy of (r)-oxybutynin and its metabolite in rats.**Biological & Pharmaceutical Bulletin,** Tokyo, v. 30, n. 5, p. 955-962, 2007b.

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

MORAES, M.L.L. et al. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da mobilidade eletroforética do analito. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

MORAES, M.L.L.; TAVARES, M.F.M.; PEREIRA, E.A. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar. Parte 2. Manipulação da velocidade da fase dispersa/secundária. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 466-470, 2010.

MUSHEEV, M.U.; FILIPTSEV, Y.; KRYLOV, S. N. Temperature difference between the cooled and the noncooled parts of an electrolyte in capillary electrophoresis.**Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, n. 20, p. 8692-8695, 2010.

NATISHAN, T.K. Recent progress in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v. 28, n.7-8, p.1115-1160, 2005.

NOVARA, G. et al. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials with antimuscarinic drugs for overactive bladder. **European Urology,** Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 740-764, 2008.

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

OKI, T.; OKURA, A. T.; YAMADA S. Advantages for transdermal over oral oxybutynin to treat overactive bladder: muscarinic receptor binding, plasma drug concentration, and salivary secretion. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** Bethesda,v. 316, n. 3, p. 1137-1145, 2005.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Apêndice A. In: _____. **Princípios de bioestatística.** 1 ª Ed. São Paulo: Thomson Learning, 2004. p. 475-478.

PAI, N.R.; DUBHASHI, D.S. Development of a validated stability indicating LC method for quantitative determination of an antispasmodic drug and its related substances. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v. 33, n. 14, p. 1359-1368, 2010.

PATRICK, K.S. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of plasma oxybutynin using a deuterated internal standard. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications,** Amsterdam, v. 487, n. 1, p. 91-98, 1989.

PENG, Z.L. et al. Effect of temperature on the enantioselectivity of basic analytes using CE with sulfated β-cyclodextrins. **Jounal of Separation Sciences**, Weinheim, v. 32, n. 20, p. 3473-3480, 2009.

POOLE, C.F. Capillary-electromigration separation techniques, In: _____. **The Essence of Chromatography**,1ª Ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2003, Cap. 8, p. 619-717.

QUIRINO, J.P.; TERABE, S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**,Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 119-135, 2000.

REIZ, J.L.; SALEM, P.; DARKE, A. C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of once-daily controlled-release oxybutynin and immediate-release oxybutynin. **Journal of Clinical Pharmacology**, Thousand Oaks, v. 47, n. 3, p. 351-357, 2007.

REZAEE, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

REZAEE, M.;YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

REZAEE, M. et al. Novel extraction method based on the dispersion of the extraction solvent for extraction of letrozole from biological fluids. **Analytical methods,** Cambridgeshire, v. 2, n. 9, p. 1341-1345, 2010.

REZAEI, F. et al. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water.**Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 158, n. 2-3, p. 621-627, 2008.

RIBEIRO, F.A.L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIGHETTI, P.G. et al. Capillary zone electrophoresis. In: HEFTMANN, E.**Chromatography**. 6ª Ed. Amsterdam: Elsevier,2004. Cap. 9, p. 369-402.

ROZET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods - Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 848-858, 2011.

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

SATHYAN, G. et al. Effect of OROS® controlled-released delivery on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxybutynin chloride. **British Journal of Clinical Pharmacology ,** Oxon, v. 52, n. 4, p. 409-417, 2001.

SHAMSIPUR, M.; FATTAHI, N. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B,** Amsterdam, v. 879, n. 28, p. 2978-2983, 2011.

SHIBUKAWA, A. et al. Binding study of desethyloxybutynin using high-performance frontal analysis method. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 768, n. 1, p. 189-197, 2002a.

SHIBUKAWA, A. et al. Plasma protein binding study of oxybutynin by high-performance frontal analysis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 768, n. 1, p. 177-188, 2002b.

SHIHABI, Z.K. Capillary electrophoresis for the determination of drugs in biological fluids. In: HEMPEL, G. **Handbook of Analytical Separations**, v. 5. Oxford: Elsevier, 2004. Cap. 3, p. 77-94.

SILVA, J.A.F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SINGTOROJ, T. et al. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Oxford, v. 41, n. 1, p. 219-227, 2006.

SKOOG, D.A. Eletroforese Capilar e Eletrocromatografia Capilar. In: _____. **Princípios da Análise Instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. Cap. 30, p. 687-699.

SKOOG, D.A. et al.Outros métodos de separação. In: _____. **Fundamentos de Química Analítica.** 8 ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. Cap. 33, p. 946-963.

STÖHRER, M. et al. Propiverine compared to oxybutynin in neurogenic detrusor overactivity - results of a randomized, double-blind, multicenter clinical study.**European Urology**, Amsterdam, v. 51, n.1, p. 235-242, 2007.

TANG, K. et al. Equilibrium studies on enantioselective extraction of oxybutynin enantiomers by hydrophilic β-cyclodextrin derivatives. **American Institute of Chemical Engineers,** Malden, v. 57, n. 11, p. 3027-3036, 2011.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

_____. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

WAGIEH, N.E. et al. Quantitative determination of oxybutynin hydrochloride by spectrophotometry, chemometry and HPTLC in presence of its degradation product and additives in different pharmaceutical dosage forms.**Talanta**, Amsterdam, v. 80, n. 5, p. 2007-2015, 2010.

WEINBERGER, R. Capillary zone electrophoresis. In: _____. **Practical capillary electrophoresis**, 2 ª Ed. New York: Academic Press, 2000. Cap. 2, p. 25-70.

XIONG, C. et al. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 572-578, 2009.

YAN, H. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 53-57, 2011.

YAZDI, A.S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S.R. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection.**Talanta**, Amsterdam, v. 75, n. 5, p. 1293-1299, 2008.

ZANG, X.H. et al. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

ZAREI, A.R.; GHOLAMIAN, F. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for spectrophotometric determination of barbituric acid in pharmaceutical formulation and biological samples. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 412, n. 2, p. 224-228, 2011.

ZGOŁA-GRZES´KOWIAK, A.; GRZES´KOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxon, v. 30, n. 9, p. 1382-1399, 2011.

ZHU, J.; HU, C.; LIU, W. Study on factors affecting reproducibility of migration time in capillary electrophoresis. **Chinese Journal of Chromatography,** Beijing,v. 24, n. 4, p. 396-401, 2006.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética

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

Of. CEP/FCFRP nº. 37/2011
dvp

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2011.

À
PROF.ª DR.ª CRISTIANE MASETTO DE GAITANI
DCF
FCFRP-USP

Prezado Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP **aprovou**, em sua 90ª Sessão Extraordinária, realizada em 27/05/2011, o projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE DE OXIBUTININA E DE N-DESETILOXIBUTININA EM URINA POR ELETROFORESE CAPILAR", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 205.**

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

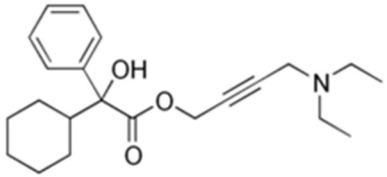
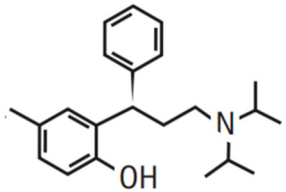
Atenciosamente,

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

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

MOREIRA, B.J. Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise de oxibutinina e de N-desetiloxibutinina em urina por eletroforese capilar. **2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.**

ERRATA

Folha	Parágrafo/linha	Onde se lê	Leia-se
ii	Linha 1	The dispersive	Dispersive
ii	Linha 10	with	and
ii	Linha 12	time	times
ii	Linha 15	were	was
9	Figura 5		
		Tolterodina	Tolterodina
11	Tabela 1	µg/mL	µg/L
22	Item 3.1.2. Parágrafo 2	foram obtidos	foi obtido
23	Item 3.1.5. Parágrafo 2	a base	base
28	Item 3.2.4.6. Parágrafo 1	na fase	para a fase
32	Linha 1	processadas	processada
55	Tabela 12	$F_{tabelado} = 3,00$	$F_{tabelado} = 4,28$
60	Linha 1	concentração do BGE	pH do BGE