UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Bruna Juliana Moreira

Ribeirão Preto
2012

RESUMO

MOREIRA, B. J. **Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para análise de oxibutinina e de N-desetiloxibutinina em urina por eletroforese capilar.** 2012. 79 f. 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 de 30 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 NaCl e 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 por dois minutos. A avaliação das características de desempenho analítico apresentou faixa linear de 90-300 ng/mL para a OXY e 187,5-750 ng/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.

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).

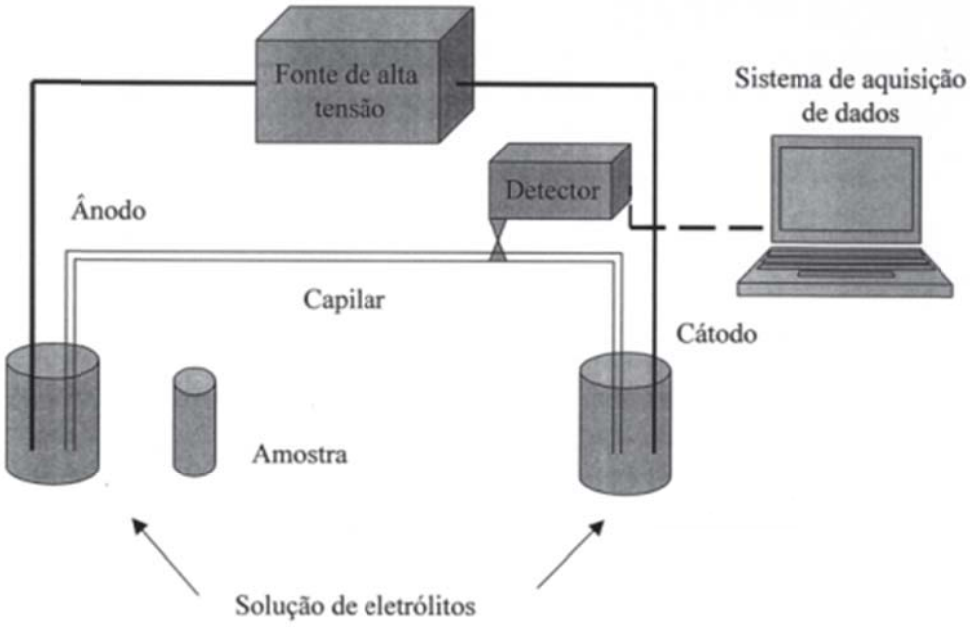


Figura 1 - Esquema do equipamento de eletroforese capilar (BONATO; JABOR; de GAITANI, 2005).

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).

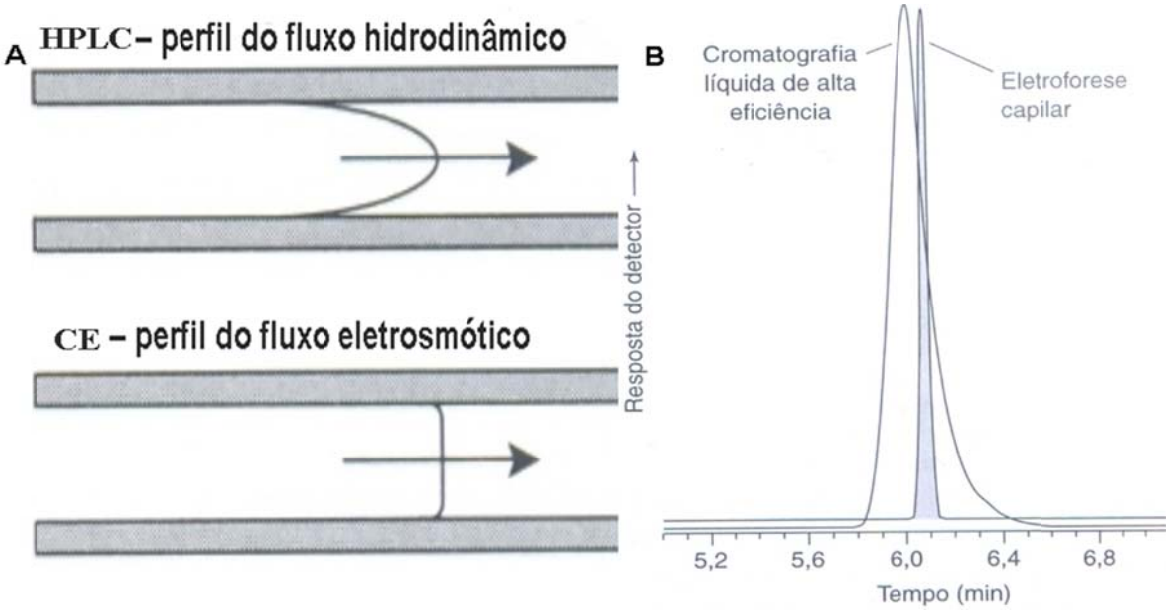


Figura 2 - Comparação entre as técnicas de HPLC e de eletromigração, como, por exemplo a CE. Em A: diferença entre os perfis dos fluxos e em B: comparação entre as eficiências (adaptado de HARRIS, 2008; HARVEY, 2000).

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).

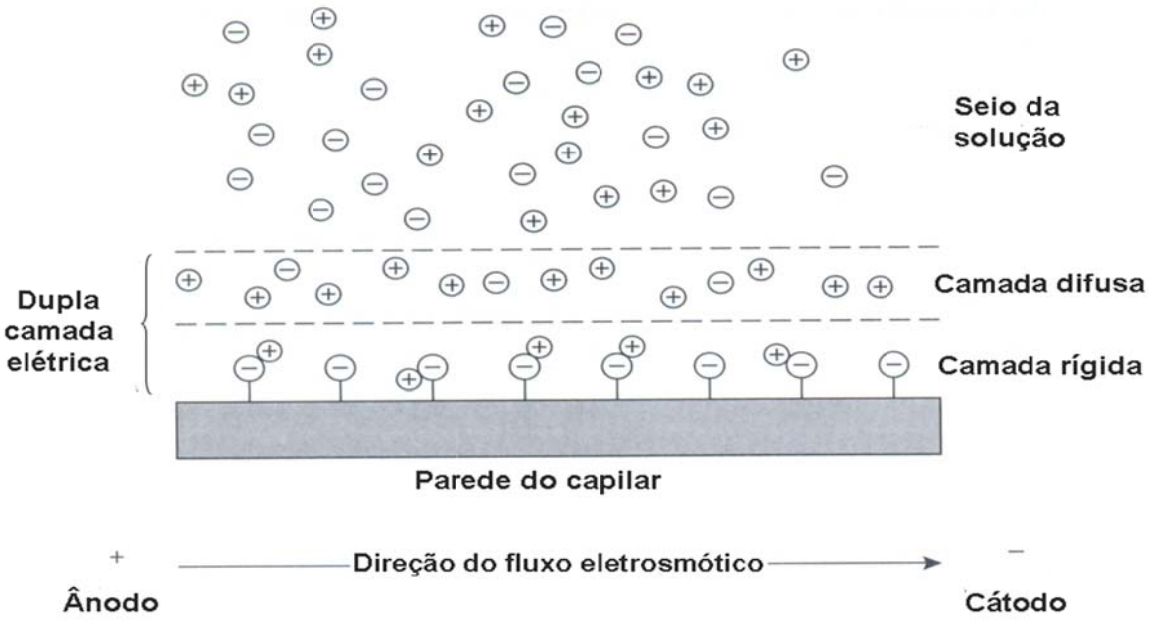


Figura 3 - Esquema representando a origem do fluxo eletrosmótico (adaptado de HARVEY, 2000).

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).

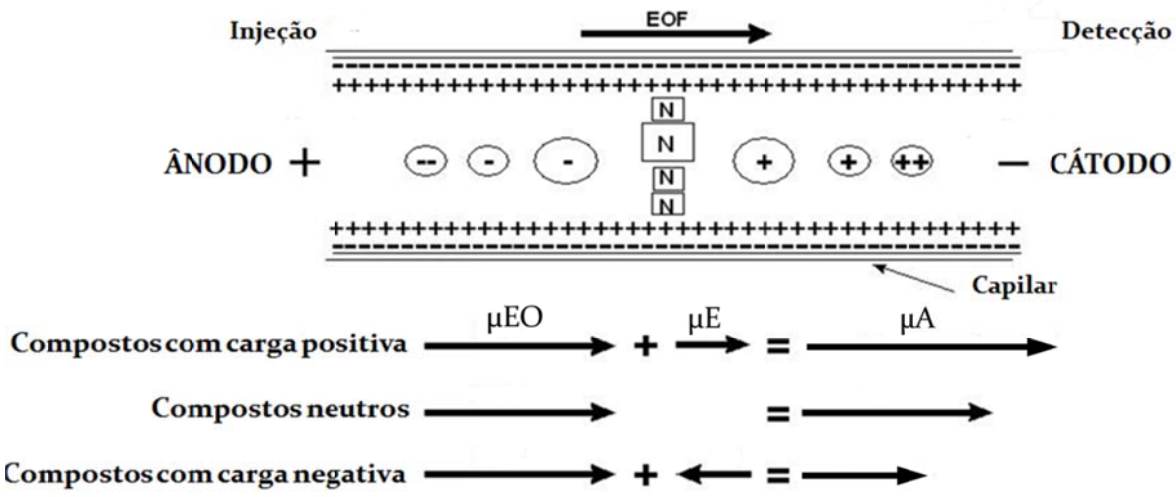


Figura 4 – Representação da migração dos analitos em FSCE (adaptado de Laboratoire Suisse d'analyse du Dopage).

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).

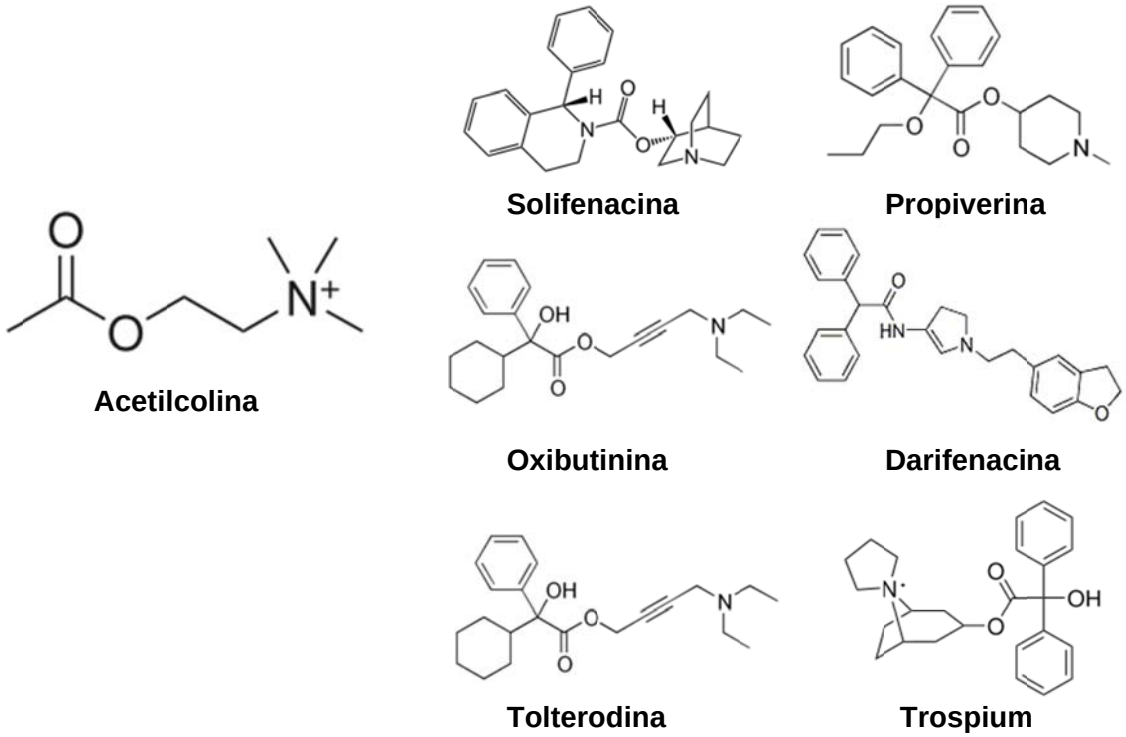


Figura 5 - Estrutura química da acetilcolina e dos antagonistas muscarínicos utilizados para o tratamento da síndrome da bexiga hiperativa (adaptado de ABRAMS; ANDERSSON, 2007).

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) glicólico seu 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).

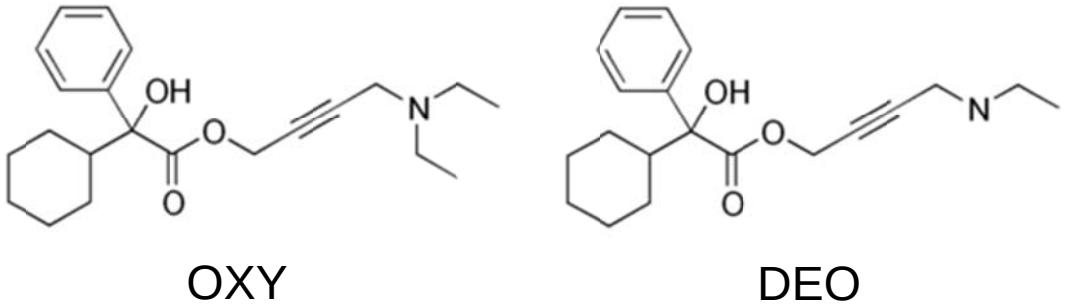


Figura 6 - Estrutura química da oxibutinina (OXY) e da N-desetiloxibutinina (DEO) (adaptada de WAGIEH et al., 2010).

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 contribuem para 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/a a 25ºC e pH 10	12900	4210
Log P a 25ºC	5,049 ± 0,454	4,163 ± 0,482
Solubilidade em água a 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 seu metabólito 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. Alguns trabalhos 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 consiste no 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 LPME desenvolvida 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, Rezaee et 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).

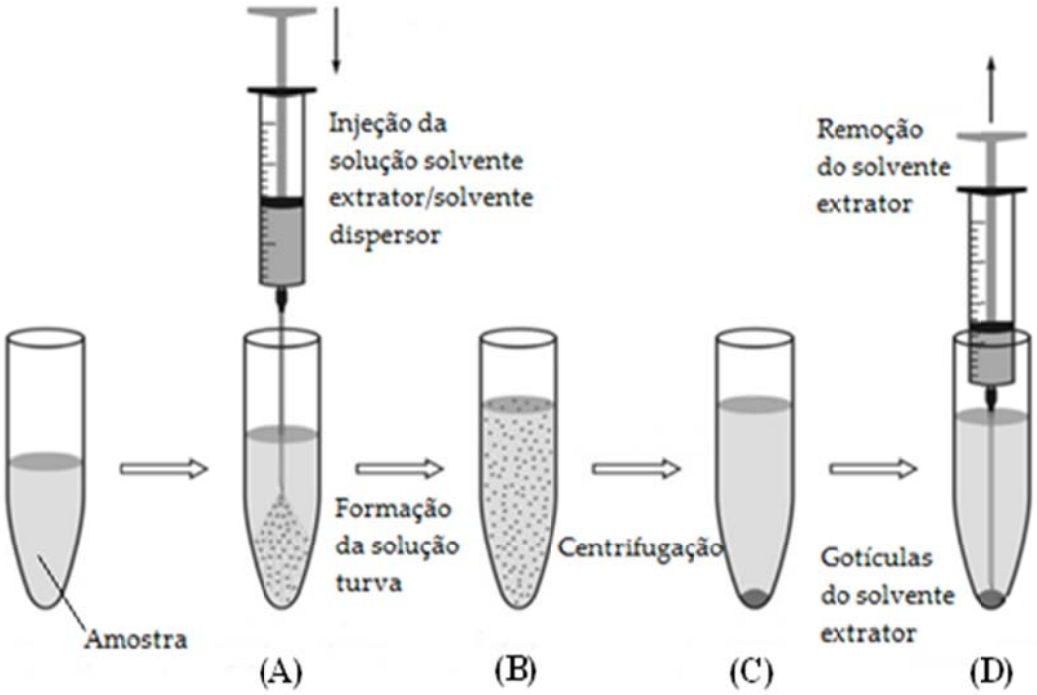


Figura 7 - Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (adaptado de ZGOŁA-GRZES´KOWIAK; GRZES´KOWIAK, 2011).

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).

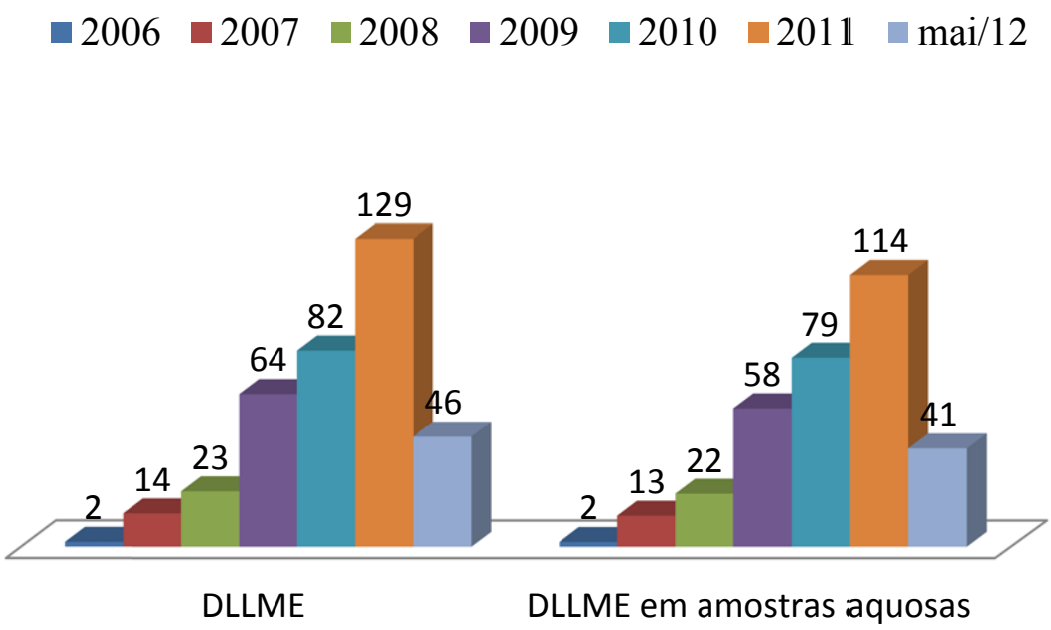


Figura 8 - Publicações da DLLME encontradas desde a criação da técnica por busca realizada na plataforma de pesquisa Web of Knowledge.

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.

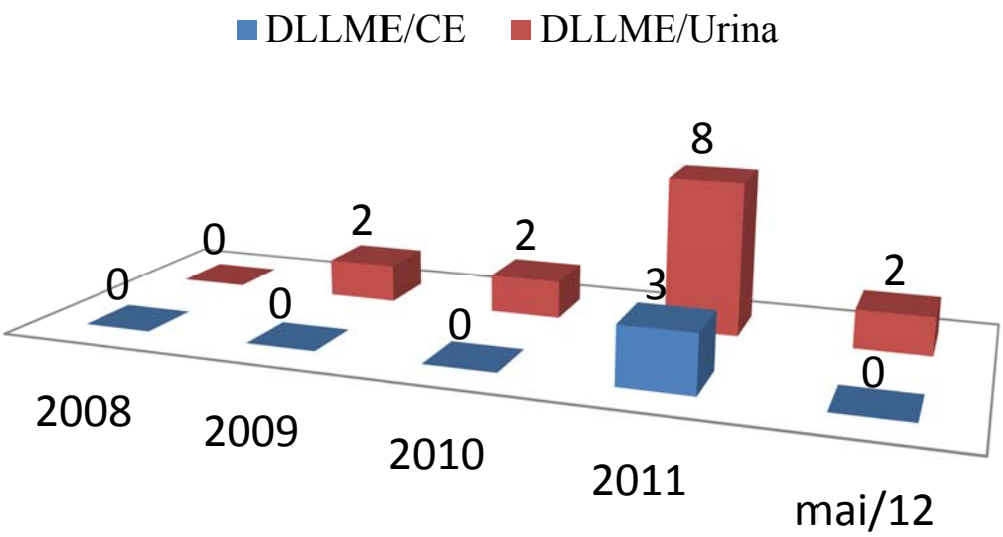


Figura 9 - Publicações da DLLME envolvendo CE e amostra biológica (urina) encontradas por busca realizada na plataforma de pesquisa Web of Knowledge.

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

ABRAMS, P.; ANDERSSON, K. Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder. **British Journal of Urology International**, 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 Urology International**, 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 experimental determination 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 Chromatography B**, 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 capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid 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 electrolysis during 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.

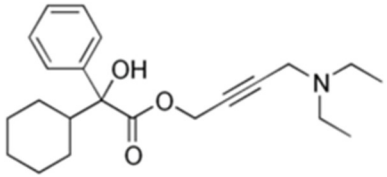
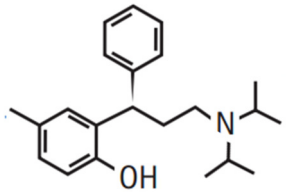
ZAREI, A.R.; GHOLAMIAN, F. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for spectrophotometric determination of barbituric acid in pharmaceutical formulation and biological samples. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 412, n. 2, p. 224-228, 2011.

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.

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