ALVARO JOSÉ DOS SANTOS NETO

Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em *tandem*
para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à
miniaturizada

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
(Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2007

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.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Santos Neto, Alvaro José dos

Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em *tandem* para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada. / Alvaro José dos Santos Neto. -- São Carlos, IQSC, 2007.
216p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Cromatografia líquida multidimensional. 2. Meios de acesso restrito. 3. Análise de fármacos. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

*A Deus, por ter sempre estado presente em minha vida,
e por nunca deixar faltar-me confiança no caminho a ser
seguido.*

Dedico esse trabalho ao meu pai, Wagner, por ter alimentado a minha curiosidade e criatividade. À minha mãe, Magda, pelo carinho e cuidado, por mais distante que eu estivesse. À minha Tia Wilma pelo incentivo para que eu buscasse os meus sonhos. À Inês, minha amada, por me dar a felicidade necessária para concretizar essa tese. A vocês, que sempre souberam compreender minha ausência durante essa jornada, dedico esse trabalho com amor, alegria e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela orientação, por ter me recebido no grupo, pelo incentivo na ampliação de meus horizontes, e por ter apoiado todas as minhas iniciativas durante a realização dessa tese.

À Prof. Dr. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, pelo incentivo, por confiar no meu potencial, e por introduzir-me ao mundo da cromatografia. Com sua autoridade, no sentido original da palavra, influenciou positivamente a minha carreira e foi determinante na escolha desse caminho. Com seus ensinamentos fui aprendendo, aos poucos, como me tornaria um cientista.

À Prof. Dr. Karin Erika Markides, por aceitar-me para o estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Jonas Bergquist, pelo apoio durante o estágio *sandwich* e pela contribuição para participar no HPLC 2007, na Bélgica.

Ao Dr. Per J. R. Sjöberg, pela supervisão direta, pelas frutíferas discussões científicas de excelente nível durante o estágio na Suécia, e também pela contribuição para participar no HPLC 2007.

Aos Profs. Drs. Carlos Alberto Montanari e Emanuel Carrilho, pelas sugestões e discussões durante o exame de qualificação.

À CAPES, pela bolsa de doutorado, bolsa PDEE no exterior e auxílio PROAP para participação em eventos.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pelo auxílio para participar no X COLACRO, em Campos do Jordão; e 28th ISCCE, em Las Vegas.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado, posteriormente cancelada na mudança para o doutorado direto.

À FAPESP, pelo indireto apoio financeiro aos projetos do laboratório; e ao IQSC, pelo apoio institucional.

A todos os amigos e colegas do CROMA, aos que já concluíram suas atividades e aos atuais alunos. Agradeço o companheirismo, os bons momentos de descontração na hora do café e a colaboração durante a realização do doutorado.

Aos colegas do Grupo de Química Analítica da Universidade de Uppsala agradeço pela agradável recepção, pelo incentivo na execução do trabalho, e pelos momentos de descontração na *canoeing trip*, *fika paus* (intervalo para o café), e no *spray bar*.

Aos Profs. Edyr C. Agostini, Doquinha (Lázaro M. D'Assunção), Pedro O. Luccas, Senhor (José Sebastião Martins), Lúcia Helena S. A. Terra, que, pelas discussões durante meu estágio como monitor e aluno de iniciação, despertaram meu interesse na química analítica.

À Prof. Dr. Maria Esperança R. Junqueira, pela tutoria no Programa Especial de Treinamento (PET).

A todos os bons professores da Universidade Federal de Alfenas, os quais contribuíram para a minha formação.

Aos amigos e colegas do GMEME, pela boa recepção e pelos momentos de diversão.

Ao amigo Christian, pela parceria na realização de muitos trabalhos, pelo companheirismo, pela preocupação e apoio nos momentos de dificuldade, e pelas sugestões na escrita da tese. E à Rafa, pela amizade e motivação.

A amiga Claudete, pela parceria nos trabalhos, pelas discussões, e por incentivar-me em muitos momentos.

Ao amigo José Carlos, pela parceria nos trabalhos, pelas diversas discussões técnicas, e pela garra que sempre demonstrou na busca pelos seus ideais.

À Alessandra M. Monteiro, pela produção de algumas das colunas capilares utilizadas no trabalho.

Ao Alexandre Cruz, pela ajuda na montagem inicial do sistema multidimensional da Shimadzu, pela amizade, e pela preocupação com as minhas necessidades.

À Regina V. Oliveira, pelas dicas iniciais na produção e utilização das colunas RAM.

Ao Felipe S. Semaan, pelo incentivo e pela colaboração em um dos trabalhos.

Ao Anil e Paulo, pelo incentivo e amizade nessa etapa final do doutorado.

Aos demais colegas de publicações, pelo engrandecimento científico.

À Odete Milão, pela amizade, e por sempre buscar a solução de todos os problemas.

Aos funcionários do CROMA, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

À Silvia e Andréia, da secretaria de PG, pela solicitude, e pelo empenho no desembargo de todos os meus processos.

Às funcionárias da biblioteca do IQSC, pelo auxílio nas minhas buscas e solicitações bibliográficas, e, especialmente à Eliana, pela correção das referências bibliográficas da tese.

Ao pessoal da oficina mecânica do IQSC, especialmente ao Alex e Ednelson, pela execução de todos os serviços e construções solicitadas.

À Prof. Dr. Maria Eugênia N. Queiroz e ao Prof. Dr. Demerval de Carvalho, pelo fornecimento de alguns dos padrões analíticos utilizados.

Ao pessoal de Alfenas, especialmente aos colegas e amigos da minha turma de graduação (Farmácia – 98/2), e aos amigos e colegas de empreendedorismo que batalharam pelo sucesso do cursinho CRA. Muitos de vocês foram importantes no caminho até aqui, não vou nomeá-los um a um para não cometer a injustiça de deixar alguém de fora.

Aos amigos em Uppsala, Karina e Daniel, Momo e Mimi, Gina e Jonas, Renato e Helena, por terem tornado muito agradável o ano no exterior; e em Göteborg, Joyce e Marcos. E, especialmente, ao Hudson, Danye, e minha pequena “sobrinha” Louli, pela grande ajuda e preocupação desde a minha chegada na Suécia, e pela grande amizade que se formou.

Aos amigos de Guaxupé, que, apesar da distância, ainda me consideram em seu círculo de amizade.

Ao meu irmão, Junior, por compreender todos os momentos que o privei de minha amizade.

Aos meus avós, Alvaro e Lourdes, e Liberato (*in memoriam*) e Laudelina, pelo amor e carinho, e por sempre zelarem pela minha vida.

A toda a minha família, porque sem essa estrutura não seria possível completar esse trabalho.

Enfim, agradeço a todos que, mesmo anonimamente, colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse chegar até aqui.

Quando concluí o ensino médio, se não estou enganado, no dia 27 de novembro de 1997, recebi uma pequena placa durante as comemorações da formatura. Muito mais que um pequeno prêmio, com os dizeres daquela placa, eu recebi o ensinamento que me conduziu até esse momento; e, que Deus permita, continuará sempre a guiar a minha vida. Segue uma transcrição desses dizeres.

Sê o melhor no que quer que fores...

Se não puderes ser um pinheiro no topo da colina,

sê um arbusto no vale, mas sê

o melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo se não puderes ser uma árvore...

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva,

e dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser estrada, sê vereda.

Se não puderes ser o sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor naquilo que fores...

Douglas Malloch

RESUMO

A análise de fármacos e outras moléculas relacionadas em fluidos biológicos é essencial no âmbito farmacêutico. Atualmente, a demanda por análises rápidas e mais complexas impulsiona a química analítica para o desenvolvimento de soluções inovadoras. A cromatografia líquida multidimensional com acoplamento de colunas para injeção direta de fluidos biológicos tem ganhado atenção nos últimos anos. Ao mesmo tempo, o acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas proporcionou marcante desenvolvimento científico na área biomédica e bioquímica. Esta tese apresenta os diversos estágios na redução da escala em sistemas de *column switching* utilizando colunas RAM, para a análise de fármacos em fluidos biológicos. Na escala convencional, com colunas de 4,6 mm de diâmetro interno, desenvolveu-se um sistema para a análise de fluoxetina em plasma. A metodologia desenvolvida foi adequadamente validada para aplicação na monitorização terapêutica, com tempo de análise de 20 minutos (incluído o preparo de amostras) e consumo de apenas 100 µL de amostra. Avaliou-se a escala *microbore* (2,1 mm), a qual apresentou excelente potencialidade para o acoplamento com a espectrometria de massas utilizando ionização por *electrospray*. Na primeira etapa em escala capilar, com colunas de 520 µm de diâmetro interno, desenvolveu-se um sistema para análise de fluoxetina em plasma. Esse sistema proporcionou análises em 25 minutos, também aplicáveis à monitorização terapêutica, consumindo poucos microlitros de amostra. Finalmente, foi desenvolvido um sistema de *column switching* capilar com colunas na ordem de 200 µm. Esse sistema foi acoplado à espectrometria de massas em *tandem* proporcionando, inovadoramente, análises altamente sensíveis e simultâneas, com baixo consumo de amostras. Um grupo de cinco antidepressivos e o alendazol, com seus produtos de biotransformação, tiveram suas análises validadas em menos de 8 minutos, consumindo menos de um microlitro de amostra. Esse sistema capilar contrasta com os sistemas convencionais comumente utilizados, os quais consomem entre centenas e milhares de vezes mais amostra para atingir a mesma detectabilidade.

ABSTRACT

Analysis of drugs and other related molecules in biofluids is essential in the pharmaceutical field. Nowadays, the development of innovative solutions in analytical chemistry has been pushed by the needs for speed and more complex analysis. Lately, multidimensional liquid chromatography using column switching for direct injection of biofluids has gained attention. At the same time, liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry provided remarkable scientific development in biomedical and biochemical area. This thesis presents the scale reduction steps in RAM column switching, for drug analysis in biofluids. In the conventional scale, using 4.6 mm i.d. columns, a system was developed, providing fluoxetine analysis in plasma. The developed method resulted in a 20 min long run, including the sample preparation step, which consumed 100 μ L of sample. The method was adequately validated, being applicable to therapeutic drug monitoring. The microbore scale (2.1 mm) was evaluated, presenting great potentiality for coupling with electrospray-mass spectrometry. In the first capillary scale step, using 520 μ m columns, a system was developed for fluoxetine analysis. Fluoxetine analysis was achieved in 25 min, within the application range for therapeutic drug monitoring, and consuming few microliters of sample. Finally, a RAM capillary column switching system employing columns on the order of 200 μ m was developed, in an innovative way. This system was coupled with a tandem mass spectrometer, rendering sensitive and simultaneous analysis with reduced sample volume. The analysis of one group containing five antidepressants, as well as the analysis of albendazol and its metabolites was validated. These analyses took only 8 minutes and consumed less than one microliter of sample. In contrast with conventional systems, this system consumes about hundreds or thousands times less sample, with the same detectability.

Lista de Figuras

Figura 1.1 Diagrama simplificado de um método cromatográfico de análise. Adaptado da referência 6.	33
Figura 1.2 Levantamento da distribuição do tempo que os analistas gastam no processo analítico. Adaptado da referência 5.	33
Figura 1.3 Principais técnicas de extração para amostras gasosas, líquidas e sólidas. Adaptado da referência 2.	34
Figura 1.4 Etapas do processo de SPE: (1) condicionamento, (2) aplicação da amostra, (3) lavagem e (4) eluição dos analitos. Adaptado de 9.	36
Figura 1.5 Princípio básico da extração por SPME. (1) introdução da agulha no frasco que contém a amostra, (2) exposição da fibra para extração dos analitos, (3) retração da fibra e remoção do dispositivo após a extração. D - dispositivo de extração, F - fibra extratora, A - amostra. Adaptado de 16.	38
Figura 1.6 Esquema de uma barra de SBSE recoberta com PDMS.	39
Figura 1.7 Módulos para MBE. (1) Módulo com canal em espiral com aproximadamente 1 mL e (2) Módulo com canal de 10 µL para acoplamento direto com HPLC. A - blocos de material inerte usados como suporte para a membrana e onde o canal é perfurado. B - Membrana suporte para o líquido orgânico. Adaptado da referência 21.....	41
Figura 1.8 Algumas possibilidades de LPME. (A) Detalhe da secção do tubo oco de LPME no interior da amostra aquosa. (B) Esquema do sistema LPME em que o tubo oco conecta duas seringas. (C) Esquema de LPME quando uma microseringa serve como suporte para o tubo oco. (D) Esquema de extração usando a opção de gota suspensa (<i>single drop extraction</i>). Adaptado de 22-24.	42
Figura 1.9 Ilustração esquemática do princípio de impressão molecular na produção de MIPs. (1) Formação de um complexo entre o modelo e monômeros funcionais antes da polimerização. (2) Polimerização na presença do complexo modelo-monômero. (3) Extração da molécula modelo da matriz polimérica. Adaptado de 9.	45
Figura 1.10 Comparação entre um sorbente de SPE convencional (não seletivo) e um sorbente misto do tipo RAM alquil diol sílica (ADS). RP = fase reversa.....	46

Figura 1.11 Esquema da retenção seletiva das moléculas pequenas e exclusão das proteínas presentes na matriz biológica injetada na coluna RAM.	46
Figura 1.12 Esquema das diferentes formas de integração entre o preparo de amostras e a separação analítica. Adaptado de 51.....	55
Figura 1.13 Esquema da formação do <i>electrospray</i> no modo positivo. Adaptado de 108.....	71
Figura 1.14 Feixe de íons inserido no analisador quadrupolar demonstrando a transmissão dos íons estabilizados (M_1) e a desestabilização dos íons não desejados no momento (M_2 e M_3). Adaptado de 126.....	74
Figura 1.15 Vista da secção perpendicular das hastes do quadrupolo. Um potencial positivo, $+(U+V\cos\omega t)$, é aplicado a um par de hastes opostas (A) e um potencial negativo, $-(U+V\cos\omega t)$, é aplicado a um par de hastes (B). As linhas tracejadas indicam os planos em que o campo elétrico resultante é igual a zero. Os eixos x e y são indicados e o eixo z está posicionado perpendicularmente ao plano do papel. Adaptado de 126.	75
Figura 1.16 Variação do potencial total aplicado em função do tempo em cada par de hastes (A – linha contínua e B – linha tracejada). Nessa representação os potenciais aplicados U e V são respectivamente iguais a 1000 V e 6000 V e a RF é ω . Adaptado de 126.....	75
Figura 1.17 Princípio de operação de um equipamento com dois analisadores quadrupolares em <i>tandem</i>	76
Figura 1.18 Estrutura química dos fármacos antidepressivos estudados. (A) desipramina, (B) nortriptilina, (C) imipramina, (D) amitriptilina, (E) clomipramina e (F) fluoxetina.....	86
Figura 1.19 Estrutura química do albendazol (A), dos seus principais produtos de biotransformação (sulfóxido de albendazol (B) e albendazol sulfona (C)), e do mebendazol (MEB) (D) (usado como padrão interno).	87
Figura 2.1 Fotografia do sistema de <i>column switching</i> desenvolvido.....	107
Figura 2.2 Detalhe do forno, contendo as colunas, e da válvula seletora de colunas.....	108
Figura 2.3 Modos de operação do sistema de column switching: (A) <i>backflush</i> e (B) <i>foreflush</i> , usando válvula seletora de seis vias e duas posições. As linhas contínuas indicam a orientação da válvula na posição A e as linhas pontilhadas indicam a orientação da válvula na posição B.	109

Figura 2.4 Sistema de empacotamento por <i>slurry packing</i> . (1) cilindro de gás nitrogênio, (2) bomba pneumática, (3) reservatório do solvente, (4) reservatório do <i>slurry</i> , (5) coluna cromatográfica e (6) descarte do solvente.	111
Figura 2.5 Fotografia das colunas convencionais desenvolvidas. Acima a coluna analítica e abaixo dessa a coluna RAM.	111
Figura 2.6 Fotografia das colunas RAM <i>microbore</i> desenvolvidas e da coluna analítica como referência (topo).	111
Figura 2.7 Sistema de pressurização dos reagentes para a modificação <i>in situ</i> da coluna. (1) cilindro de gás nitrogênio, (2) válvula agulha, (3) válvula de 3 vias, (4) reservatório para os reagentes, (5) coluna e (6) descarte.	112
Figura 2.8 Avaliação da capacidade de exclusão das proteínas pela coluna RAM e comparação com a injeção e coleta do eluato por análise em fluxo (FIA). Porcentagem de exclusão obtida pelo cálculo das proteínas totais usando o método de Bradford.....	116
Figura 2.9 Perfil de exclusão cromatográfica das proteínas do plasma após injeção de 100 μL de amostra. Comprimento de onda = 280 nm.....	116
Figura 2.10 Cromatograma em modo <i>foreflush</i> comparado com cromatograma de uma injeção em branco.....	118
Figura 2.11 Cromatograma em modo <i>backflush</i> comparado com cromatograma de uma injeção em branco.....	118
Figura 2.12 Comparação entre os cromatogramas obtidos nos modos <i>foreflush</i> e <i>backflush</i>	119
Figura 2.13 Curva analítica obtida para a FLU, contendo os intervalos de confiança e previsão estatisticamente calculados.	121
Figura 2.14 Gráfico de resíduos para o ajuste dos dados experimentais da FLU à reta de regressão linear.....	122
Figura 2.15 Comparação entre o ajuste de uma reta e uma parábola aos dados experimentais para a curva analítica da FLU.....	122
Figura 2.16 Comparação entre um cromatograma do LQ e um cromatograma de injeção de amostra branca subsequente à injeção do ponto mais alto da curva analítica.	123

Figura 2.17 Exclusão das macromoléculas do plasma após a injeção de 20 μL de amostra sob uma vazão de 1 mL min^{-1} . Comprimento de onda = 280 nm.	124
Figura 2.18 Separação de PAR, FLU e CLO em cromatografia com <i>column switching</i> em escala <i>microbore</i> . (1) PAR, (2) FLU e (3) CLO.....	125
Figura 2.19 Separação de DES, NOR, IMI e AMI em cromatografia com <i>column switching</i> em escala <i>microbore</i> . (1) DES, (2) NOR, (3) IMI e (4) AMI.	125
Figura 2.20 Cromatograma ilustrando a separação dos anti-helmínticos em plasma bovino, usando um sistema <i>microbore</i> . (1) SOX, (2) SON, (3) ALB, (PI) MEB e (*) interferentes..	126
Figura 3.1 Configuração do sistema de <i>column switching</i> com arranjo de colunas capilares analítica e RAM.....	136
Figura 3.2 Fotografia do sistema de <i>microcolumn switching</i> desenvolvido nessa parte do trabalho.	136
Figura 3.3 Detalhe do amostrador automático e da válvula seletora de colunas contendo as colunas capilares.....	136
Figura 3.4 Esquema do sistema de empacotamento por CO_2 supercrítico. (1) cilindro de gás CO_2 , (2) bomba seringa, (3) válvula agulha, (4) válvula de 3 vias, (5) reservatório para as partículas de fase estacionária, (6) coluna cromatográfica, (7) restritor e (8) banho de ultra-som aquecido.	137
Figura 3.5 Fotografia das colunas capilares de 520 μm de <i>i.d.</i> empacotadas para uso no sistema de <i>microcolumn switching</i> . Acima a coluna analítica e abaixo dessa a coluna RAM.	139
Figura 3.6 Cromatograma da exclusão das proteínas através de coluna RAM-BSA-C18 capilar sob vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ de água. Comprimento de onda = 280 nm.	141
Figura 3.7 Comparação entre os modos <i>backflush</i> e <i>foreflush</i> para a realização de <i>column switching</i>	143
Figura 3.8 Cromatograma do teste para verificação do efeito de memória.....	143
Figura 3.9 Cromatograma de uma injeção de plasma fortificado com FLU a 100 ng mL^{-1}	145
Figura 4.1 Fotografia do sistema usado do empacotamento das colunas capilares por <i>slurry</i> . (A) Bomba de HPLC e banho ultra-som contendo o conjunto de empacotamento. (B) Vista superior do banho de ultra-som contendo o reservatório do <i>slurry</i> e a coluna capilar.....	156

Figura 4.2 Fotografia do tipo de <i>hardware</i> utilizado para a retenção do <i>frit</i> e preparo das colunas capilares (esquerda), e colunas analíticas e RAM preparadas (direita).....	157
Figura 4.3 Arranjo instrumental do sistema de <i>column switching</i> LC-ESI-MS/MS. O modo <i>backflush</i> (ou seja, com inversão de coluna) está esquematizado na válvula seletora e as duas possibilidades de <i>hardware</i> para colunas RAM desenvolvidas nesse trabalho (<i>frit</i> feito com filtro de fibra de vidro e sem <i>frit</i>) estão ilustradas no detalhe.	157
Figura 4.4 Perfil de exclusão das macromoléculas após a injeção de um microlitro de plasma humano. 1- sistema em fluxo, 2- coluna RAM-BSA-C18, 3- coluna ADS.	162
Figura 4.5 Espectro de massas dos interferentes encontrados após extração de um pedaço de resina epóxi.....	165
Figura 4.6 Comparação do perfil de separação dos ADs usando-se diferentes fases estacionárias.	166
Figura 4.7 Comparação do perfil de separação dos AHs usando-se diferentes fases estacionárias	167
Figura 4.8 Influência da fase móvel sobre a resposta do ESI-MS e separação cromatográfica.	167
Figura 4.9 Influência da fase móvel sobre a resposta do ESI-MS e separação cromatográfica.	168
Figura 4.10 Avaliação da focalização dos picos usando <i>column switching</i> e cromatografia unidimensional. Traço 1: injeção em fluxo (60 nL); traço 2: <i>column switching</i> (500 nL); traço 3: <i>column switching</i> (1,9 µL); traço 4: <i>column switching</i> (3,8 µL); traço 5: unidimensional (60 nL); e traço 6: injeção em fluxo (500 nL).	169
Figura 4.11 Influência do modo de <i>column switching</i> (<i>backflush</i> x <i>foreflush</i>) sobre a simetria do pico e eficiência. Painel (A) AHs em modo <i>foreflush</i> ; (B) AHs em modo <i>backflush</i> (para os AHs, os picos 1-4 são SOX, SON, MEB, e ALB, respectivamente); (C) ADs em modo <i>foreflush</i> ; e (D) ADs em modo <i>backflush</i> (para os ADs, os picos 1-6 são DES, FLU, NOR, IMI, AMI, e CLO, respectivamente).	170
Figura 4.12 Avaliação da capacidade de carregamento (<i>loading capacity</i>) da coluna RAM (1 cm de comprimento). Painel (A) Gráfico normalizado da tendência linear e máximo de carregamento proveniente da injeção simultânea de 11 fármacos; (B) Gráfico da comparação entre as curvas de saturação dos dois mais intensos picos isotópicos da FLU.....	174

Figura 4.13 Condições de fragmentação ajustadas para os ADs.....	176
Figura 4.14 Condições de fragmentação ajustadas para os AHs.....	176
Figura 4.15 Efeito da nebulização sobre a resposta do ESI-MS para os ADs. A Série A representa o modo <i>ion spray</i> com gás de nebulização a 40 psi. A Série B representa o modo ESI puro (sem gás de nebulização).	177
Figura 4.16 Efeito da nebulização sobre a resposta do ESI-MS para os AHs. A Série A representa o modo <i>ion spray</i> com gás de nebulização a 40 psi. A Série B representa o modo ESI puro (sem gás de nebulização).	177
Figura 4.17 Avaliação do efeito de matriz sobre a ionização por ESI-MS. Painel (A) TIC; (B) MRM da DES, (C) MRM do SOX. Corridas 1-5: sem injeção, injeção de água, injeção de plasma diluído (1:2), injeção de urina diluída (1:2) e injeção de padrão, respectivamente. ...	178
Figura 4.18 Comparação entre a pré-coluna ADS (A) e XDS (B) para os ADs em plasma. Fase móvel de limpeza: 10% ACN + 20 mM acetato de amônio/amônia, pH 7,4.....	181
Figura 4.19 Comparação entre a pré-coluna ADS (A) e XDS (B) para os AHs em plasma. Fase móvel de limpeza: água.....	181
Figura 4.20 Cromatograma representativo da separação e detecção em modo MRM dos dez fármacos e produtos de biotransformação estudados neste trabalho, dentro de uma janela de eluição de apenas 2,5 minutos. Os picos são: (1) SOX, (2) SON, (3) MEB, (4) DES, (5) FLU, (6) ALB, (7) NOR, (8) IMI, (9) AMI e (10) clomipramina.	183
Figura 4.21 Curvas analíticas para os AHs em plasma. Reta de regressão ajustada para os resultados ponderados (1/x), utilizando MEB como padrão interno. (A) SOX, (B) SON e (C) ALB.	186
Figura 4.22 Curvas analíticas para os ADs em plasma. Reta de regressão ajustada para os resultados ponderados (1/x), utilizando FLU-d5 como padrão interno. (A) DES, (B) NOR, (C) IMI, (D) AMI e (E) FLU.	186
Figura 4.23 Curvas analíticas para os ADs em urina. Reta de regressão ajustada para os resultados ponderados (1/x), utilizando FLU-d5 como padrão interno. (A) DES, (B) NOR, (C) IMI, (D) AMI e (E) FLU.	187

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Classificação dos suportes RAM. Adaptado de 40 e 41.....	48
Tabela 1.2 Comparação entre os modos <i>off-line</i> e <i>online</i> de LC multidimensional.....	53
Tabela 1.3 Nomenclatura para classificação da cromatografia líquida realizada em diferentes escalas.....	58
Tabela 1.4 Modos de operação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. ..	77
Tabela 1.5 Percentagem de recuperação aceitável dependendo do nível de concentração do analito.	79
Tabela 1.6 Percentagens de RSD aceitáveis obtidas pela função de Horwitz e do programa <i>Peer Verified Methods</i> (PVM) da AOAC para diferentes níveis de concentração dos analito.	79
Tabela 2.1 Precisões obtidas para o método desenvolvido.....	120
Tabela 2.2 Exatidões e recuperações obtidas para o método desenvolvido.	121
Tabela 3.1 Programação de eventos do software Class-VP para a execução automatizada das etapas de preparo de amostras e separação analítica.	139
Tabela 3.2 Precisão observada durante a validação do método.....	145
Tabela 4.1 Dados de validação para os fármacos antidepressivos em plasma.	184
Tabela 4.2 Dados de recuperação para os fármacos antidepressivos em urina.	184
Tabela 4.3 Dados de validação para o albendazol e seus produtos de biotransformação em plasma.....	185
Tabela 4.4 Recuperações relativas e exatidões obtidas para o albendazol e seus produtos de biotransformação.	185

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	acetonitrila (<i>acetonitrile</i>)
ADS	alquil diol sílica
ADs	antidepressivos
AHs	anti-helmínticos
ALB	albendazol
AMI	amitriptilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemistry</i>
APCI	ionização química à pressão atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
API	ionização à pressão atmosférica (<i>atmospheric pressure ionization</i>)
APPI	fotoionização à pressão atmosférica (<i>atmospheric pressure photo ionization</i>)
ASE	extração acelerada com solvente (<i>accelerated solvent extraction</i>)
BSA	albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumine</i>)
CAD	fragmentação ativada por colisão (<i>collisional activated dissociation</i>)
CBB	<i>coomasie brilliant blue</i>
CE	eletroforese capilar (<i>capillary electrophoresis</i>)
CEC	eletrocromatografia capilar (<i>capillary electrochromatography</i>)
CID	fragmentação induzida por colisão (<i>collisional induced dissociation</i>)
cLC	cromatografia líquida capilar (<i>capillary liquid chromatography</i>)
CLO	clomipramina
CRM	modelo da carga residual (<i>charge residue model</i>)
DC	corrente contínua (<i>direct current</i>)
DES	desipramina
ECD	detector de captura de elétrons (<i>electron capture detector</i>)
EI	ionização por impacto de elétrons (<i>electron impact ionization</i>)
ESI	ionização por electrospray (<i>electrospray ionization</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	análise por injeção em fluxo (<i>flow injection analysis</i>)
FL	detector de fluorescência (<i>fluorescence detector</i>)
FLU	fluoxetina
FT-ICR	ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (<i>Fourier transform-ion cyclotron resonance</i>)

GC	cromatógrafo a gás ou cromatografia gasosa
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRGC	cromatografia gasosa de alta resolução (<i>high resolution gas chromatography</i>)
IAE	extração por imunoafinidade (<i>immunoaffinity extraction</i>)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEM	modelo da evaporação do íon (<i>ion evaporation model</i>)
ILE	extração com fase líquida imobilizada (<i>immobilized liquid extraction</i>)
IMI	imipramina
ISRP	superfície interna com fase reversa (<i>internal surface reversed-phase</i>)
LC	cromatografia líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LC-LC	cromatografia líquida com acoplamento de colunas (<i>coupled column LC</i>)
LCxLC	cromatografia líquida comprehensiva (<i>comprehensive LC</i>)
LD	limite de detecção (<i>detection limit</i>)
LLE	extração líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LPME	microextração em fase líquida (<i>liquid phase microextraction</i>)
LPS	suporte com partículas grandes (<i>large particle supports</i>)
LQ	limite de quantificação (<i>quantitation limit</i>)
MALDI	desorção e ionização a laser assistida por matriz (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MBE	extração com membranas (<i>membrane extraction</i>)
MEB	mebendazol
MeOH	metanol (<i>methanol</i>)
MIP	polímero molecularmente impresso (<i>molecularly imprinted polymer</i>)
MRM	monitoramento de reações múltiplas (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	espectrometria de massas em tandem (<i>tandem mass spectrometry</i>)
MSPD	dispersão da matriz em fase sólida (<i>matrix solid phase dispersion</i>)
NMR	ressonância magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOR	nortriptilina
NPD	detector de nitrogênio-fósforo (<i>nitrogen-phosphor detector</i>)
PAR	paroxetina
PDMS	polidimetilsiloxano (<i>polydimethylsiloxane</i>)
PEEK	poliéter éter cetona (<i>polyether ether ketone</i>)
PK/BE	farmacocinética e/ou bioequivalência (<i>pharmacokinetics/bioequivalence</i>)

PVM	<i>Peer Verified Methods</i>
Q	quadropolo (<i>quadrupole</i>)
QqQ	triplo quadropolo
RAM	meios de acesso restrito (<i>restricted access media</i>)
RAM-LC-MS/MS	cromatografia líquida com acoplamento de colunas (<i>column switching</i>) e detecção por espectrometria de massas em tandem
RAM-LC-UV	cromatografia líquida com acoplamento de colunas (<i>column switching</i>) e detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta
RF	rádio frequência (<i>radio frequency</i>)
RP	fase reversa (<i>reversed phase</i>)
RSD	desvio padrão relativo (<i>relative standard deviation</i>)
S/N	razão sinal-ruído (<i>signal-to-noise ratio</i>)
SBSE	extração por sorção em barra de agitação (<i>stir bar sorptive extraction</i>)
SFC	cromatografia com fluido supercrítico (<i>supercritical fluid chromatography</i>)
SFE	extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SIM	monitorização de íon selecionado (<i>selected ion monitoring</i>)
SLM	extração com membrana encharcada com líquido (<i>supported liquid membrane extraction</i>)
SON	albendazol sulfona
SOX	sulfóxido de albendazol
SPE	extração com fluido supercrítico (<i>supercritical fluid extraction</i>)
SPE-CE	extração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida
SPE-LC	extração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida
SPME	microextração em fase sólida (<i>solid phase microextraction</i>)
SPS	superfície semi-permeável (<i>semi-permeable surface</i>)
SSRI	inibidores seletivos da recaptação de serotonina (<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>)
TCAs	antidepressivos tricíclicos (<i>tricyclic antidepressants</i>)
TDM	monitorização terapêutica de fármacos (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
TEA	trietilamina (<i>triethylamine</i>)
TIC	cromatograma do íon total (<i>total ion chromatogram</i>)
ToF	tempo de voo (<i>time of flight</i>)
WCOT	coluna tubular aberta com parede recoberta (<i>wall coated open tubular</i>)
XDS	troca catiônica diol sílica (<i>cation exchange diol silica</i>)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

INTRODUÇÃO GERAL27

CAPÍTULO 1

1 PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS31

1.1 ETAPAS DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO32

1.2 TÉCNICAS MODERNAS PARA PREPARO DE AMOSTRAS LÍQUIDAS.....34

1.2.1 Técnicas com aprisionamento do analito35

1.2.1.1 Extração em fase sólida (SPE)35

1.2.1.2 Microextração em fase sólida (SPME).....37

1.2.1.3 Extração por sorção em barra de agitação (SBSE).....38

1.2.2 Técnicas com transferência do analito para outra fase líquida39

1.2.2.1 Extração por membrana (MBE)40

1.2.2.2 Microextração em fase líquida (LPME)	41
1.2.3 Combinação direta do preparo de amostras e separação analítica	42
1.2.3.1 Uso de extração por imunoafinidade (IAE).....	43
1.2.3.2 Uso de extração com polímeros molecularmente impressos (MIP).....	44
1.2.3.3 Uso de extração com meios de acesso restrito (RAM).....	45
2 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS	49
2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MULTIDIMENSIONAL.....	52
2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MINIATURIZADA	57
2.2.1 Nomenclatura.....	57
2.2.2 Aspectos fundamentais em LC miniaturizada.....	59
2.2.2.1 Atuação da coluna no alargamento da banda cromatográfica	60
2.2.2.2 Influência do volume morto extracoluna no alargamento dos picos	62
2.2.3 Instrumentação	64
2.2.3.1 Sistema de propulsão da fase móvel.....	64
2.2.3.2 Injetor	65
2.2.3.3 Detector	66
2.2.4 Técnicas para preparo de colunas.....	66
3 LC-MS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS	68
3.1 IONIZAÇÃO DOS ANALITOS	68
3.1.1 Ionização por <i>electrospray</i> (ESI).....	69
3.1.2 Ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI)	72
3.2 EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL.....	72
3.2 ANALISADORES PARA MS	73

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	78
4.1 EXATIDÃO E PRECISÃO	80
4.2 RECUPERAÇÃO	81
4.3 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE	82
4.4 SENSIBILIDADE E DETECTABILIDADE	83
4.5 ESTABILIDADE	83
4.6 CALIBRAÇÃO E INTERVALO DE LINEARIDADE	84
5 FÁRMACOS DE INTERESSE NOS ESTUDOS REALIZADOS.....	85
5.1 ANTIDEPRESSIVOS	85
5.2 ANTI-HELMÍNTICOS.....	86
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO	104
2 OBJETIVO	105
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	105
3.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	105
3.2 SISTEMA DE <i>COLUMN SWITCHING</i>	107
3.3 PREPARO DAS COLUNAS	110
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A ESCALA CONVENCIONAL.....	113
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A ESCALA <i>MICROBORE</i>.....	113

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS PADRÕES ANALÍTICOS PARA A VALIDAÇÃO	114
3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE FLUOXETINA	114
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4.1 SISTEMA EM ESCALA CONVENCIONAL	115
4.2 SISTEMA EM ESCALA <i>MICROBORE</i>	123
5 CONCLUSÃO.....	127
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

CAPÍTULO 3

1 INTRODUÇÃO	133
2 OBJETIVO	133
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	134
3.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	134
3.2 INSTRUMENTAÇÃO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR COM <i>COLUMN SWITCHING</i>	135
3.3 PREPARO DAS COLUNAS	137
3.4 PREPARO DE AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	138
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS PADRÕES ANALÍTICOS	140
3.6 QUANTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO	140
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
5 CONCLUSÃO.....	146
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

CAPÍTULO 4

1 INTRODUÇÃO	149
2 OBJETIVO	151
3 PARTE EXPERIMENTAL	152
3.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	152
3.2 PREPARO DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS DE PLASMA E URINA.....	153
3.3 PREPARO DAS COLUNAS CAPILARES	154
3.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXCLUSÃO	158
3.5 TESTE DE INJEÇÃO EM FLUXO E EM COLUNA NO MODO UNIDIMENSIONAL.....	158
3.6 CROMATOGRAFIA	158
3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	160
3.8 TESTE DO EFEITO DE MATRIZ	161
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
4.1 DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS RAM CAPILARES.....	161
4.2 DESENVOLVIMENTO DA ABORDAGEM DE <i>COLUMN SWITCHING</i>	166
4.3 EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E FILTRAÇÃO	171
4.4 CAPACIDADE DE CARREGAMENTO (<i>LOADING CAPACITY</i>) DA COLUNA CAPILAR ADS.....	173
4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FRAGMENTAÇÃO POR MS/MS.....	175
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NEBULIZAÇÃO NA IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i>	176
4.7 EFEITO DE MATRIZ SOBRE A ESI E SOBRE A EXTRAÇÃO COM RAM....	178

4.8 APLICABILIDADE DO SISTEMA DESENVOLVIDO E RESULTADOS DAS VALIDAÇÕES	181
5 CONCLUSÃO.....	188
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
CONCLUSÃO GERAL	196
APÊNDICES	
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSA DA FRAGMENTAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS ESTUDADOS E ROTA DE FRAGMENTAÇÃO SUGERIDA.	200
APÊNDICE B – ESPECTROS DE MASSA DA FRAGMENTAÇÃO DOS ANTI-HELMÍNTICOS ESTUDADOS E ROTA DE FRAGMENTAÇÃO SUGERIDA.....	206
SÚMULA CURRICULAR	211

INTRODUÇÃO GERAL

“Never follow the beaten track, it leads only where others have been before!”

Alexander Graham Bell

INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de novos medicamentos é composto de diversas etapas de pesquisa e a análise de fármacos em fluidos biológicos é imprescindível em muitas delas. A análise de uma miríade de protótipos, os estudos farmacocinéticos e tóxicocinéticos, o estabelecimento do perfil dos produtos de biotransformação, os estudos clínicos e a elaboração da formulação são algumas das etapas que demandam tal tipo de análise. Diversos países têm adotado, com sucesso, uma política de medicamentos genéricos. Com esse novo nicho de mercado, surgiu a necessidade de análises de biodisponibilidade dos fármacos no plasma sanguíneo, como forma de demonstrar a bioequivalência entre o medicamento genérico e o medicamento de referência previamente desenvolvido. Outra área que utiliza tais análises é a monitorização terapêutica de fármacos (TDM) com estreita janela terapêutica, permitindo o ajuste da melhor dosagem do medicamento para cada paciente. A toxicologia forense e social também se beneficia das análises de fármacos e outros xenobióticos de interesse em fluidos biológicos, como nos casos de investigações criminais, por exemplo, overdose e acompanhamento de tratamentos de desintoxicação.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais empregada na análise de fármacos em fluidos biológicos. Depois da introdução da técnica de ionização à pressão atmosférica (API) por *electrospray* (ESI), o acoplamento da HPLC com a espectrometria de massas (LC-MS) permitiu grande avanço das análises de interesse farmacêutico. Apesar da atenção direcionada à etapa de separação analítica, o adequado preparo de amostras de fluidos biológicos é fundamental para garantir uma análise satisfatória.

A demanda por um grande número de análises, em curto prazo, tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas onde as etapas de preparo de amostra e separação analítica são integradas. Dentre as estratégias empregadas, a utilização de cromatografia líquida

multidimensional no modo denominado *column switching* permite a injeção direta de fluidos biológicos no sistema analítico e tem recebido ampla atenção. Outro aspecto da modernização das técnicas analíticas é a tendência para a miniaturização. Em HPLC, a miniaturização produz melhores resultados e, especialmente em LC-MS, permite maior compatibilidade entre as técnicas, maximizando o desempenho de ambas.

Neste trabalho investigou-se a cromatografia líquida multidimensional utilizando colunas com meios de acesso restrito (RAM), em *column switching*, como estratégia para a injeção direta de amostras de fluidos biológicos. Assim, foram desenvolvidos sistemas automatizados para a análise de diversos fármacos, contemplando desde a escala convencional até a escala capilar da cromatografia líquida.

Para melhor organização, esta tese foi dividida em quatro capítulos compreendendo a descrição da importância do trabalho realizado no contexto atual, além da discussão dos sistemas e estratégias desenvolvidos para a análise de fármacos antidepressivos (desipramina, imipramina, nortriptilina, amitriptilina e fluoxetina) e do anti-helmíntico albendazol e seus principais produtos de biotransformação (sulfóxido de albendazol e albendazol sulfona).

O **Capítulo 1** apresenta uma revisão da literatura sobre a importância do desenvolvimento de técnicas modernas e o estado da arte sobre o preparo de amostras, a separação analítica e o papel da miniaturização para a análise de fármacos em fluidos biológicos. Também se faz uma introdução sobre a espectrometria de massas (MS) e as características de seu acoplamento com a cromatografia líquida (LC). Brevemente apresentam-se os aspectos pertinentes à validação de métodos bioanalíticos e, finalmente, os fármacos estudados nos diversos seguimentos desse trabalho são sucintamente descritos.

No **Capítulo 2** descreve-se o desenvolvimento, otimização e validação de metodologia para análise de fluoxetina em plasma utilizando sistema de *column switching* em escala convencional com colunas cromatográficas e RAM preparadas no próprio laboratório. A

seguir apresentam-se os aspectos da redução da escala para o arranjo *microbore* utilizando colunas de 2,1 mm de diâmetro interno e a investigação da separação dos antidepressivos e anti-helmínticos em amostras de plasma, incluindo plasma bovino proveniente de estudo de biodisponibilidade de medicamento genérico veterinário.

O **Capítulo 3** descreve a primeira etapa da miniaturização do sistema de *column switching* compreendendo os estudos com colunas capilares de 520 µm de diâmetro interno. Nesse capítulo apresenta-se o desenvolvimento de um sistema RAM-LC-UV miniaturizado para análise de fluoxetina em plasma.

No **Capítulo 4** apresenta-se a última etapa da miniaturização e o seu acoplamento com a espectrometria de massas em *tandem*. Nessa parte do trabalho utilizaram-se colunas entre 320 e 200 µm de diâmetro interno em um sistema RAM-LC-MS/MS miniaturizado desenvolvido para análise simultânea de antidepressivos e anti-helmínticos em plasma e urina.

CAPÍTULO 1

Análise de fármacos em fluidos biológicos utilizando cromatografia e espectrometria de massas

“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta, mas gostar daquilo
que se faz.”

Leonardo da Vinci

1 PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

A análise de fármacos em amostras biológicas tem se tornado mais importante atualmente. Avanços tais como os trazidos pela química combinatorial, genômica, proteômica e bioinformática têm revolucionado a descoberta de novos fármacos. Dessa forma, a busca por fármacos mais efetivos e a melhor compreensão de suas atividades terapêuticas e toxicológicas são alguns dos fatores que alimentam a demanda por ferramentas adequadas à análise de amostras biológicas.¹

O conhecimento dos níveis de fármacos em fluidos biológicos, tais como soro, plasma e urina, permite a otimização da terapia farmacológica e fornece informações para estudos de farmacocinética, biodisponibilidade, fármaco- e tóxico-genética, função de órgãos e interações medicamentosas. A análise quantitativa e qualitativa de fármacos e produtos de biotransformação é muito aplicada em estudos farmacocinéticos. Na aprovação de novos fármacos e desenvolvimento de novas formulações, o tempo necessário para atingir a concentração máxima, o tempo para eliminação e a biodisponibilidade são alguns dos parâmetros que devem ser conhecidos.^{2,3} A lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999,⁴ estabeleceu o uso dos medicamentos genéricos no Brasil e, desde então, a indústria farmacêutica nacional tem vivido grande crescimento nessa área, demandando grande número de estudos farmacocinéticos para bioequivalência e biodisponibilidade.

A TDM é ferramenta importante na melhoria do tratamento de fármacos com estreito intervalo terapêutico. A análise de drogas ilícitas em matrizes biológicas e a avaliação da intoxicação com fármacos e outros xenobióticos são outros exemplos de aplicações que se valem de ferramentas analíticas e são desenvolvidas no âmbito da toxicologia forense e clínica. Nesse caso, a varredura e a confirmação de drogas em fluidos biológicos são

importantes para a detecção e tratamento dos usuários e controle das pessoas que seguem alguma terapia.^{2,3}

Fluidos biológicos são matrizes complexas que contêm proteínas, sais, ácidos, bases, e outros compostos orgânicos endógenos, os quais dificultam a determinação dos analitos ali contidos. Adicionalmente, muito frequentemente esse composto de interesse está presente em uma concentração baixa, inferior àquela de muitos outros compostos também presentes na matriz.² Para esse tipo de determinação, diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas, dependendo do analito alvo e do objetivo da aplicação. Entretanto, apesar do avançado estágio de desenvolvimento de muitas técnicas analíticas, a etapa de preparo de amostras (também chamada de pré-tratamento da amostra) é indispensável em muitos casos.

1.1 ETAPAS DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

O processo analítico completo é dividido em diversas etapas incluindo: amostragem, preparo da amostra, separação, detecção e análise dos dados. A Figura 1.1 ilustra as etapas envolvidas em uma análise completa. Um levantamento realizado na década de 90 indicou que o preparo de amostras era responsável por 61% do tempo total gasto no processo analítico de uma amostra (ver Figura 1.2),⁵ enquanto que outra fonte estimou que 80% do tempo de análise era consumido entre as etapas de amostragem e preparo de amostra.² Apesar do levantamento citado acima também mostrar que mais de 90% dos entrevistados considerava o preparo de amostras “muito importante” ou “moderadamente importante”, pode-se afirmar que o preparo de amostras ainda é uma área negligenciada, em comparação com a etapa analítica propriamente dita. Muitas análises podem ser feitas em minutos, algumas vezes até em segundos, já o preparo de amostras pode levar horas ou mesmo dias. O principal objetivo

Figura 1.1 Diagrama simplificado de um método cromatográfico de análise. Adaptado da referência 6.

da técnica de preparo de amostras é extrair, isolar e concentrar os analitos de interesse da amostra complexa, transferindo-os para um meio que possa ser facilmente introduzido no sistema analítico.^{2,7} Uma técnica de preparo de amostras ideal deve ter as seguintes características: gerar perda mínima da amostra, com adequada recuperação; eliminar os interferentes da matriz; elevar a concentração do analito; apresentar compatibilidade com a técnica analítica; ser baseada em procedimento convenientemente simples, robusto, reprodutível e rápido; e ter baixo custo.^{2,7} Entretanto, muitas técnicas tradicionais de preparo de amostras apresentam uma série de desvantagens, tais como procedimentos complicados e demorados, consumo de grande quantidade de amostras e solventes, e dificuldade de automatização.

Figura 1.2 Levantamento da distribuição do tempo que os analistas gastam no processo analítico. Adaptado da referência 5.

1.2 TÉCNICAS MODERNAS PARA PREPARO DE AMOSTRAS LÍQUIDAS

Atualmente há algumas vertentes que levam ao desenvolvimento de novas abordagens para a área de ciências da separação. Desenvolvimento de materiais com mecanismos bio-específicos ou altamente seletivos, miniaturização e automatização são algumas possibilidades que podem ser exploradas individualmente ou combinadas, em novas técnicas de preparo de amostras.⁸ Por exemplo, nessa tese, as três possibilidades descritas acima foram agrupadas nos sistemas desenvolvidos nos dois último capítulos. A Figura 1.3 apresenta as principais técnicas de extração usadas para amostras gasosas, líquidas e sólidas. Nessa figura, as técnicas apresentadas à esquerda são as mais tradicionais, enquanto que as técnicas mais modernas estão posicionadas à direita. Extração com membranas (MBE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase líquida (LPME), extração em fase sólida (SPE) e extração com fluido supercrítico (SFE) são as técnicas modernas que geralmente podem ser usadas no preparo de amostras biológicas líquidas. Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e extração acelerada com solventes (ASE), por outro lado, são comumente aplicadas às matrizes sólidas.

Figura 1.3 Principais técnicas de extração para amostras gasosas, líquidas e sólidas. Adaptado da referência 2.

Há grande analogia entre várias técnicas de preparo de amostras e a separação analítica, podendo freqüentemente o preparo de amostras ser considerado o primeiro prato no processo de separação. Entretanto, esse prato oferece baixa capacidade discriminatória, que é compensada pela alta capacidade de carregamento de amostra. Outra analogia é a concentração dos analitos na etapa de preparo, a qual geralmente é conseguida explorando-se o efeito de focalização típico da cromatografia.⁷

A tradicional técnica de extração líquido-líquido (LLE), apesar de ainda ser amplamente empregada, apresenta limitações relacionadas ao consumo de solventes, formação de emulsões e dificuldade de automatização, entre outras. Modificações na LLE tradicional permitem procedimentos automatizados ou semi-automatizados. Basicamente, uma estação de manipulação dos solventes é operada por sistema robotizado, geralmente realizando os procedimentos em uma placa contendo 96 poços (*96-well LLE plate*).

As técnicas de preparo de amostras líquidas podem ser agrupadas de acordo com as características do procedimento de extração. Um dos grupos baseia-se no aprisionamento dos analitos em uma fase imobilizada em um suporte, por exemplo, SPE, SPME, e técnicas análogas. O outro grupo inclui as técnicas que fazem a transferência dos analitos da amostra líquida para um segundo solvente, por exemplo, LPME, MBE e SFE.⁷

1.2.1 Técnicas com aprisionamento do analito

1.2.1.1 Extração em fase sólida (SPE)

A SPE tem sido amplamente adotada no preparo de amostras para análises de fármacos e drogas de abuso em matrizes biológicas. Algumas das vantagens da SPE sobre a LLE são: alta recuperação, razões de concentração mais efetivas, menor consumo de

solventes, ausência da formação de espuma ou emulsão, tempo de preparo mais curto, operação mais fácil e maior facilidade para automatização.⁷

A SPE é baseada na partição dos analitos entre a amostra líquida e a fase extratora presente no suporte sólido e/ou adsorção desses compostos pela fase sólida (dependendo do tipo de fase sólida usada). A retenção pode envolver interações não-polares, polares ou iônicas. A Figura 1.4 ilustra o procedimento de SPE.

Existem diversos formatos de SPE, tais como, cartuchos, discos, bandejas perfuradas, colunas, ponteiros e as formas miniaturizadas (por exemplo, SPME). A automatização pode ser obtida de diversas maneiras, dependendo do formato utilizado. Algumas possibilidades são: a utilização de sistemas robotizados que reproduzem o procedimento manual adotado com os cartuchos convencionais; a utilização de sistemas robotizados que manipulam pequenos cartuchos (individuais ou em placas) por meio de válvulas e bombas; e a utilização de sistemas acoplados com a cromatografia líquida, por meio da seleção de colunas (*column switching*). O acoplamento direto com a cromatografia, por meio de *column switching*, e com a utilização de suportes RAM, polímeros molecularmente impressos (MIP) e imunosorbentes, será detalhado na seção 1.2.3.

Figura 1.4 Etapas do processo de SPE: (1) condicionamento, (2) aplicação da amostra, (3) lavagem e (4) eluição dos analitos. Adaptado de 9.

1.2.1.2 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME, desenvolvida por Pawliszyn et al. em 1990, é uma nova técnica de preparo de amostras, a qual utiliza uma fibra de sílica fundida ou metal recoberta por uma fase extratora adequada.¹⁰ Quando a fibra é exposta no interior da amostra ou no seu *headspace*, os analitos são extraídos para a fase extratora de recobrimento, de acordo com a sua afinidade por ela. A Figura 1.5 ilustra o procedimento de extração por SPME. Para uma maior seletividade e extração de analitos com diferentes características, as fibras de SPME são comercializadas com diferentes fases extradoras, tais como polidimetilsiloxano, poliacrilato, carbowax, carboxen, etc. Depois de extraídos, os analitos podem ser dessorvidos diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (GC) ou no interior de uma interface apropriada para o acoplamento com o cromatógrafo a líquido (HPLC).¹⁰ Em 2002 Lord e Pawlyszyn¹¹ revisaram a utilização da SPME para a extração de fármacos e drogas de abuso. Mais recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma interface aquecida para o acoplamento SPME-HPLC, e os resultados conseguidos foram melhores do que aqueles obtidos com dessorção *off-line* ou sem aquecimento.¹²⁻¹⁴

Outro formato de SPME utiliza a extração no interior de um tubo (*in-tube* SPME). Nesse caso um tubo aberto (similar a uma coluna WCOT de GC) ou empacotado com algum material seletivo (por exemplo, RAM) é utilizado. O tubo de SPME pode ser acoplado a um amostrador automático e a amostra é aspirada/ejetada sucessivas vezes através do tubo, garantindo assim uma extração satisfatória. Em seguida o sistema pode ser lavado e então acoplado ao HPLC para realização da dessorção dinâmica, proporcionada pela fase móvel.¹⁵

Figura 1.5 Princípio básico da extração por SPME. (1) introdução da agulha no frasco que contém a amostra, (2) exposição da fibra para extração dos analitos, (3) retração da fibra e remoção do dispositivo após a extração. D - dispositivo de extração, F - fibra extratora, A - amostra. Adaptado de 16.

1.2.1.3 Extração por sorção em barra de agitação (SBSE)

Outra técnica análoga à SPME é a SBSE. Nesse caso uma barra de agitação magnética é recoberta pela fase extratora. A Figura 1.6 esquematiza uma barra de SBSE. Como o volume da fase de recobrimento é muito maior que aquele presente nas fibras de SPME, a SBSE consegue melhor recuperação que a SPME para analitos que não apresentam afinidade muito alta pela fase extratora.¹⁷ A extração é realizada simplesmente pela colocação da barra para ser agitada no interior da amostra, ou mesmo, suspendendo-a no interior do *headspace*. A dessorção dos analitos pode ser efetuada em um dispositivo apropriado para a dessorção térmica, adaptado no injetor do GC; ou pela dessorção em fase líquida apropriada, que deve ser injetada no GC ou HPLC. A primeira opção geralmente fornece melhor recuperação para compostos termo-resistentes com boa volatilização, no entanto apresenta alto custo para

Figura 1.6 Esquema de uma barra de SBSE recoberta com PDMS.

implementação. A segunda, apesar de menos eficiente, devido à diluição dos analitos dessorvidos em um volume superior ao que pode ser injetado, é muito mais barata e pode ser usada para compostos termolábeis. O único material de revestimento comercialmente disponível, no momento, é o polidimetilsiloxano (PDMS). Assim, a possibilidade de sucesso em aplicações para compostos muito polares fica comprometida, caso não seja feita derivatização.

1.2.2 Técnicas com transferência do analito para outra fase líquida

A LLE é o exemplo típico da transferência dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis. No entanto, outras técnicas também se baseiam em procedimento análogo. Na SFE a fase extratora não é um líquido propriamente dito, contudo o fenômeno que ocorre durante a extração baseia-se na transferência dos analitos da amostra para o fluido supercrítico. Aplicações da SFE para o preparo de amostras de fluidos biológicos não são muito comuns. Geralmente faz-se necessária a mistura da amostra com um suporte sólido particulado adequado. Adicionalmente, uma etapa de coleta deve ser implementada para aprisionar os analitos arrastados pelo fluido supercrítico. Radcliffe et al.¹⁸ revisaram a utilização de SFE em ciências forense e descrevem aplicações para fluidos biológicos. Além disso, Turner et al.¹⁹ detalharam a etapa da coleta na extração por fluido supercrítico, incluindo aplicações com amostras biológicas.

1.2.2.1 Extração por membrana (MBE)

Existem diversas variações da técnica de MBE. A mais utilizada para preparo de amostras de fluidos biológicos baseia-se em uma membrana que funciona como suporte para uma fase líquida orgânica imiscível que faz o intermédio entre a fase doadora (que contém a amostra) e a fase aceptora (responsável pelo aprisionamento dos analitos). Esse formato é chamado de *supported liquid membrane extraction* (SLM) em inglês e pode ser realizado em dispositivos com diversos formatos. A Figura 1.7 apresenta alguns módulos que podem ser usados na MBE. Jönsson e Mathiasson^{20,21} revisaram os diversos tipos de MBE e suas aplicações. Basicamente, o procedimento de extração realiza-se pela transferência dos analitos de uma fase doadora aquosa contendo a amostra para uma fase receptora também aquosa. Uma membrana encharcada com um líquido orgânico imiscível em meio aquoso divide o canal ao meio, impedindo o contato direto entre a fase aceptora e a doadora. Diversas estratégias, tais como controle de pH, utilização de agentes complexantes, anticorpos, ou aplicação de potencial elétrico são usadas para garantir que os analitos de interesse atravessem a membrana orgânica e difundam-se na fase aceptora, sem retornar para a fase doadora. Um exemplo típico é o controle de pH para fazer com que os analitos ionizáveis estejam na forma não-dissociada na fase doadora, migrando para a membrana não-polar. Em seguida, por difusão, esses analitos atingem a fase aceptora a qual, por estar em outro pH, mantém o analito aprisionado na forma dissociada. Algumas vantagens atribuídas à MBE são a simplicidade, possibilidade de ligação em linha com HPLC e seletividade de extração. Por outro lado, as extrações podem ser demoradas, havendo a necessidade de controle das condições de análise para evitar efeito de memória entre as extrações e, algumas aplicações, exigem grande consumo de amostra para atingir adequada sensibilidade.

Figura 1.7 Módulos para MBE. (1) Módulo com canal em espiral com aproximadamente 1 mL e (2) Módulo com canal de 10 μ L para acoplamento direto com HPLC. A - blocos de material inerte usados como suporte para a membrana e onde o canal é perfurado. B - Membrana suporte para o líquido orgânico. Adaptado da referência 21.

1.2.2.2 Microextração em fase líquida (LPME)

Algumas configurações de LPME têm o mesmo princípio e podem ser consideradas MBE. A única diferença é que a membrana passa a ser nesse caso um tubo poroso impregnado de solvente, o qual separa a fase doadora externa e a fase aceptora em seu interior. A Figura 1.8 ilustra algumas possibilidades de LPME; os detalhes B e C ilustram os casos em que a LPME segue o mesmo princípio da MBE. No detalhe D outra abordagem é usada: nesse caso a gota de solvente orgânico imiscível é colocada em contato com a amostra em agitação. Analitos com grande afinidade pelo solvente orgânico podem, assim, ser extraídos em modo análogo ao que acontece em LLE. Essa abordagem, mesmo sendo muito interessante, requer grande destreza manual e apresenta dificuldade para ser automatizada. Além disso, apesar de perfeitamente compatível com GC, o fato de a extração ser baseada em solvente orgânico imiscível em meio aquoso impossibilita a inserção direta na maioria das aplicações para HPLC. Algumas revisões na literatura contemplam as diversas possibilidades de LPME, incluindo algumas aplicações para fluidos biológicos.^{7,22}

Figura 1.8 Algumas possibilidades de LPME. (A) Detalhe da secção do tubo oco de LPME no interior da amostra aquosa. (B) Esquema do sistema LPME em que o tubo oco conecta duas seringas. (C) Esquema de LPME quando uma microseringa serve como suporte para o tubo oco. (D) Esquema de extração usando a opção de gota suspensa (*single drop extraction*). Adaptado de 22-24.

1.2.3 Combinação direta do preparo de amostras e separação analítica

Algumas das opções de preparo de amostras apresentadas anteriormente podem, em certas condições, ser acopladas diretamente com a cromatografia. Por exemplo, *in-tube* SPME e alguns formatos de SLM são compatíveis e viáveis para acoplamento com HPLC. Entretanto, as separações com acoplamento de colunas, consideradas como um tipo de separação multidimensional e também chamadas de *column switching*, inerentemente compatibilizam o preparo de amostras com o HPLC. Nesse tipo de abordagem a primeira coluna extrai e, então, o sistema direciona a fração da amostra contendo os analitos para a separação na segunda dimensão. Essa abordagem é confiável, robusta e mais barata que outras

alternativas de automatização.⁸ Enquanto a automatização de outras técnicas de preparo de amostras exige a robotização de diversas atividades, o sistema de *column switching* pode ser automatizado simplesmente pela adição de uma válvula seletora de colunas a um HPLC contendo um amostrador automático. Geralmente os sorbentes usados em *column switching* apresentam algum tipo de seletividade e compatibilidade com a injeção direta de fluidos biológicos permitindo, assim, que as pré-colunas (colunas empregadas na primeira dimensão) sejam utilizadas repetidas vezes. Alguns dos sorbentes comumente encontrados em aplicações com *column switching* são MIP, meios com imunoafinidade e RAM.

1.2.3.1 Uso de extração por imunoafinidade (IAE)

Essa técnica é baseada na capacidade dos anticorpos em reconhecer e ligar especificamente a determinados sítios (epitopos) de compostos alvo. Anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico de mamíferos como resposta a presença de substâncias estranhas (antígenos). Assim, anticorpos para hormônios, enzimas, proteínas, vírus e peptídeos são simples de obter. Moléculas pequenas são mais difíceis de ativar uma resposta imunológica e precisam ser ligadas a uma molécula suporte para atingir tal propósito. Geralmente uma proteína é usada como suporte e o complexo formado (hapteno) deve ter uma conformação adequada para fazer com que o anticorpo reconheça exatamente o analito alvo, em vez de todo o complexo. Imunoensaios são, algumas vezes, utilizados para a determinação de compostos em fluidos biológicos. Apesar de ser uma técnica de alta produtividade (*high throughput*), sensível e com certa seletividade, anticorpos são sujeitos a reações cruzadas com moléculas análogas, por exemplo, metabólitos.⁹

Em IAE os anticorpos são covalentemente ligados a um suporte apropriado e empacotados em uma pré-coluna de SPE. O protocolo de imunoextração consiste das mesmas

etapas daquele da SPE. A IAE confere alta seletividade à análise, extraindo e concentrando o composto ou grupo de compostos análogos alvo, direcionando uma fração purificada para a etapa de separação.^{8,25} As desvantagens dos imunosorbentes incluem o alto custo e tempo para produção de um meio seletivo. Além do tempo de produção poder levar de meses a anos, o resultado para moléculas pequenas pode não ser muito seletivo. Outra desvantagem é a sensibilidade dos anticorpos a variações de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos. Dessa forma, uma alternativa interessante que tem surgido é a fabricação de polímeros biomiméticos, assim chamados MIPs.

1.2.3.2 Uso de extração com polímeros molecularmente impressos (MIP)

MIPs têm ampla aplicação, podendo ser usados como meio para separação,²⁶ extração,²⁷ ou mesmo como estratégia para ganho de seletividade em sistemas de detecção.²⁸ Basicamente, uma rede polimérica é criada ao redor de uma molécula modelo. Em seguida o modelo é removido e a cavidade impressa permanece com afinidade química e estérica pela molécula modelo (ver Figura 1.9). O material formado apresenta seletividade pela molécula alvo ou pela classe de moléculas estruturalmente relacionadas, sendo de grande interesse para aplicações analíticas. Como no caso da IAE, colunas empacotadas com MIP podem ser usadas seguindo protocolos similares aqueles de SPE convencional. Em comparação com a IAE, MIPs mantêm uma boa seletividade e são muito mais baratos e simples de preparar.⁹

Figura 1.9 Ilustração esquemática do princípio de impressão molecular na produção de MIPs. (1) Formação de um complexo entre o modelo e monômeros funcionais antes da polimerização. (2) Polimerização na presença do complexo modelo-monômero. (3) Extração da molécula modelo da matriz polimérica. Adaptado de 9.

1.2.3.3 Uso de extração com meios de acesso restrito (RAM)

Há diferentes tipos de materiais com a mesma finalidade de atuar como RAM. Basicamente, esses materiais apresentam características sortivas mistas permitindo a combinação dos princípios da cromatografia por exclusão para as macromoléculas hidrofílicas e da cromatografia em fase reversa ou troca iônica para as moléculas pequenas. Esses sorbentes previnem o acesso das macromoléculas aos sítios de retenção devido à existência de uma barreira física e/ou química, evitando a sorção irreversível dessas moléculas. Dessa forma, apenas às pequenas moléculas é garantida a interação com a fase extratora presente na superfície protegida das partículas. A Figura 1.10 ilustra a diferença entre um sorbente convencional de SPE e um sorbente RAM. A Figura 1.11 esquematiza a retenção seletiva das moléculas pequenas enquanto as proteínas são excluídas. A grande vantagem desse tipo de material sobre os outros sorbentes para SPE é a capacidade de lidar com repetidas injeções de grandes volumes de fluidos biológicos sem a alteração de suas propriedades retentivas.²⁹⁻³¹

Figura 1.10 Comparação entre um sorbente de SPE convencional (não seletivo) e um sorbente misto do tipo RAM alquil diol sílica (ADS). RP = fase reversa.

Figura 1.11 Esquema da retenção seletiva das moléculas pequenas e exclusão das proteínas presentes na matriz biológica injetada na coluna RAM.

A expressão meio de acesso restrito (do inglês, *restricted access media* – RAM) foi introduzida por Desilets et al. em 1991 como um termo geral para suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de fluidos biológicos e limitam a interação dentro dos poros apenas para as moléculas pequenas.³² Geralmente, atribui-se a criação desse novo tipo de

material a Hagestam e Pinkerton que em 1985 apresentaram o conceito de *internal surface reversed-phase* (ISRP) para a análise de fármacos em fluidos biológicos.³³ Contudo, os trabalhos de Yoshida a partir de 1982 apresentam o mesmo conceito usando partículas recobertas por proteínas.^{34,35} O uso das colunas RAM e as classificações dos diversos suportes já foram revisados há alguns anos³⁶⁻³⁹ e, bem recentemente, elas têm crescido em interesse com algumas novas revisões.^{30,31,40}

Inicialmente, as fases RAM foram classificadas de acordo com o princípio de exclusão macromolecular. As fases com barreira física usam o tamanho do poro para evitar a difusão das proteínas, já as fases com barreira química utilizam uma rede polimérica para evitar o acesso das macromoléculas ao interior dos poros. Boos e Rudolphi³⁸ ampliaram essa classificação, considerando o tipo de grupo ligado na superfície interna e externa das partículas. Assim, subdividiu-se a classificação em fases com topoquímica homogênea (tipos A e C) e com topoquímica heterogênea (tipos B e D). Cassiano et al.⁴⁰ recentemente revisitaram o assunto e, utilizando a classificação entre fases unimodais e bimodais com barreiras físicas e químicas apresentada por Boos et al.,^{38,41} fizeram interessante levantamento histórico do desenvolvimento de diversos sorbentes RAM. A Tabela 1.1 ilustra e define a classificação dos diferentes tipos de RAM desenvolvidos e disponíveis comercialmente.

Dos diferentes tipos de suporte existentes, utilizaram-se nessa tese os suportes dos tipos B e D. As fases tipo B usadas foram as LiChrosphere ADS C18 e XDS; essas fases são caracterizadas pela existência de grupos diol ligados na superfície externa do suporte. Na superfície interna dos poros de 6 nm as fases ADS têm grupos alquílicos ligados, enquanto a fase XDS tem o ácido sulfônico para fornecer a capacidade de troca catiônica.⁴²⁻⁴⁴

Tabela 1.1 Classificação dos suportes RAM. Adaptado de 40 e 41.

Ilustração	Tipo de barreira	Topoquímica da superfície	Classificação	Produtos comerciais
Física	Homogênea (Uniforme)	Tipo A	ChromSpher 5 Biomatrix (Chrompack) CAT-PBA (Recipe GmbH)
Física	Heterogênea (Dual)	Tipo B	ISRP GFF II (Regis Technologies) LiChrosphere ADS LiChrosphere XDS (Merck VWR)
Química	Homogênea (Uniforme)	Tipo C	Hisep (Supelco) Capcell Pak MF (Shiseido)
Química	Heterogênea (Dual)	Tipo D	Ultrabiosep (Shandon) BioTrap 500 (ChromTech) SPS (Regis Technologies) MAYI-ODS (Shimadzu)

A fase tipo D constituída de albumina sérica bovina (BSA) imobilizada sobre o suporte C18 por meio de entrecruzamento com glutaraldeído foi obtida segundo o protocolo descrito por Menezes e Felix.⁴⁵ Nesse suporte, a presença de uma rede de BSA imobilizada sobre a superfície externa da partícula impede o acesso das macromoléculas hidrofílicas aos grupamentos alquílicos protegidos ao mesmo tempo que dificulta a adsorção dessas sobre a superfície externa. O suporte tipo D *semi-permeable surface* (SPS) foi desenvolvido por Desilets et al.³². Esse suporte atualmente é comercializado pela Regis Technologies em

partículas de 5 µm contendo o grupo polietilenoglicol recobrando a superfície externa e protegendo os grupos alquílicos disponíveis no seu interior.

2 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

A escolha das técnicas analíticas a serem empregadas no desenvolvimento de uma determinada metodologia deve responder a uma série de questões. Entre elas, o tipo de matriz, a concentração esperada para os analitos, a necessidade de medidas quantitativas ou qualitativas, a precisão exigida, o custo da análise, o custo dos equipamentos e as exigências de produtividade são alguns dos itens que devem ser considerados.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a determinação de fármacos e biocompostos. Imunoensaios, tais como radioimunoensaios e enzima-imunoensaios, e técnicas eletroanalíticas são usadas em algumas determinações ou triagens. Entretanto, a complexidade das matrizes biológicas praticamente inviabiliza a análise confiável de fármacos nesses meios, se não for utilizada alguma forma de pré-processamento e separação dos constituintes da amostra. Sabe-se que mesmo a espectrometria de massas, que inicialmente chegou a ser considerada como não dependente de separações analíticas, necessita de um adequado preparo de amostras e mínima separação, para que esteja realmente livre dos efeitos da matriz. Assim, as técnicas de separação são consideradas como a unidade central de um método para análise de fármacos em fluidos biológicos.

As técnicas de separação permitem que os compostos presentes em misturas sejam separados devido às suas diferentes propriedades. Técnicas cromatográficas podem ser desenvolvidas em tubos ou em placas planas. As técnicas em tubo usam algum tipo de material como fase estacionária, o qual é colocado no interior do tubo consistindo, assim, a

coluna cromatográfica. A separação cromatográfica ocorre quando um fluido percola pela coluna arrastando, seletivamente, os analitos que apresentam diferentes afinidades pela fase estacionária. A cromatografia em fase gasosa (GC), e especialmente a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) tem diversas aplicações para análise de fármacos em fluidos biológicos. A HRGC é baseada em uma coluna capilar de sílica fundida, a qual tem sua parede interna recoberta por uma fina película de fase estacionária. Um gás inerte é usado como fase móvel e o controle da temperatura é o principal responsável pela seletiva separação dos compostos análogos. Entretanto, devido ao fato de muitos fármacos serem polares e ácidos ou básicos, a análise por GC deve ser precedida pela derivatização desses compostos. Com a derivatização, praticamente todos os tipos de compostos podem ser analisados, contudo mais uma etapa é adicionada ao procedimento analítico, somando-se mais uma potencial fonte de erros. A HPLC, principalmente a HPLC em fase reversa (RP) é altamente compatível com a análise de fármacos, sendo o modo mais comum de operação da LC na atualidade.

Geralmente, RP-HPLC utiliza partículas de sílica como suporte para ligação da fase adequada. Cadeias alquílicas são as mais empregadas como fase ligada nesses suportes, especialmente a fase C18 (que consiste de cadeia octadecil ligada à superfície de sílica). Em RP um solvente mais polar que a fase estacionária é usado como fase móvel. Dessa forma, a fase móvel é composta de água ou solução tampão aquosa misturada com solventes orgânicos polares, tais como acetonitrila e metanol. O principal mecanismo de separação em RP-HPLC é a partição dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Nesse equilíbrio de partição os compostos menos polares são os mais retidos na fase estacionária alquílica. Fenômenos adsorptivos também estão presentes entre os mecanismos de retenção. Assim, compostos básicos são comumente afetados pela adsorção em grupos silanóis residuais de fases estacionárias que não apresentam um recobrimento/desativação completo desses grupos.

Outras técnicas de separação também têm suas aplicações nessa área. A eletroforese capilar (CE) é baseada na migração diferencial dos analitos carregados através de um tubo capilar de sílica fundida mantido sob o efeito de um campo elétrico. O capilar é preenchido com uma solução tampão aquosa e é conectado entre dois reservatórios que contêm a mesma solução. A mobilidade dos analitos é dependente da mobilidade eletroforética das espécies ionizadas e do fluxo eletrosmótico. A mobilidade eletroforética por sua vez é dependente da natureza do íon (cátion ou ânion), tamanho, forma e propriedades físico-químicas da solução tampão. Devido ao fato do fluxo eletrosmótico causar menor alargamento dos picos eletroforéticos, a eficiência da separação por CE é maior do que aquela da cromatografia. Por outro lado, a CE apresenta menor capacidade de carregamento de amostra e maior dificuldade para ser automatizada em linha com sistemas de preparo de amostras. Outro formato que apresenta algumas vantagens sobre a CE é a eletrocromatografia capilar (CEC). Essa técnica é um misto entre cromatografia e CE, e apresenta forte apelo para futuras aplicações em análises de fármacos em fluidos biológicos.

A cromatografia com fluido supercrítico (SFC) é uma técnica híbrida entre LC e GC. O fluido supercrítico é formado quando um fluido é colocado acima de sua temperatura e pressão críticas. Assim, o fluido supercrítico tem propriedades de ambos, líquidos e gases. Dióxido de carbono é a fase móvel mais empregada em SFC. O poder de solvatação do fluido supercrítico é controlado pela pressão aplicada na coluna. Apesar de receber certa atenção alguns anos atrás, atualmente poucos métodos utilizam SFC para análise de fármacos em fluidos biológicos. Entretanto, aparentemente nova atenção tem sido devotada à SFC e esse assunto foi revisitado em algumas apresentações do 31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2007), em Ghent, Bélgica.

2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MULTIDIMENSIONAL

A cromatografia líquida multidimensional (também conhecida como cromatografia com acoplamento de colunas ou *column switching*) representa uma poderosa ferramenta e um procedimento alternativo para os clássicos métodos baseados em HPLC unidimensional.⁴⁶ A LC multidimensional pode ser realizada em modo *online* ou *off-line*. No modo *off-line* as frações eluídas da primeira coluna são coletadas manualmente ou em coletor de frações e então reinjetadas na segunda coluna. Essa abordagem tem a vantagem de ser simples e não requer uma válvula seletora de colunas. Entretanto, os procedimentos demandados são laboriosos e consomem muito tempo. As técnicas *online* têm a vantagem de serem automatizadas por meio de uma válvula seletora de colunas. A automação melhora a confiabilidade e capacidade de processamento de amostras, reduzindo o tempo de análise e a perda de amostras. Uma limitação do acoplamento *online* entre colunas é que as fases móveis usadas devem ser compatíveis uma com a outra. Uma comparação entre as vantagens e desvantagens dos modos *online* e *off-line* é apresentada na Tabela 1.2.⁴⁶

A nomenclatura usada em cromatografia multidimensional pode gerar certa controvérsia. A existência de diversos termos (alguns sendo usados como sinônimos e outros não) é a fonte para a inomogeneidade e confusão. O termo cromatografia multidimensional é definido como o uso de duas ou mais colunas ou técnicas cromatográficas para gerar melhor separação, incluindo o preparo de amostras, o aumento da resolução, da produtividade, ou capacidade de picos.⁴⁷ Essa definição também inclui como sinônimos a cromatografia com acoplamento de colunas (*coupled column chromatography*) e *column switching*.

Tabela 1.2 Comparação entre os modos *off-line* e *online* de LC multidimensional.

Cromatografia líquida multidimensional <i>off-line</i>	
<u>Vantagens</u>	<u>Desvantagens</u>
- Uso facilitado pela coleta de frações	- Trabalhosa
- Permite concentrar volumes coletados	- Mais demorada
- Permite trabalhar com fases móveis incompatíveis	- Perda de amostra ou contaminação durante o manuseio
Cromatografia líquida multidimensional <i>online</i>	
<u>Vantagens</u>	<u>Desvantagens</u>
- Fácil de automatizar	- Não aceita incompatibilidade entre as fases móveis
- Nenhuma perda ou contaminação externa	- A separação obtida na primeira fase pode, pelo menos parcialmente, ser reduzida na segunda
- Redução no tempo de análise	- Requer instrumentação automatizada para apresentar vantagens
- Mais reprodutível	

Entretanto, em alguns lugares, o termo cromatografia multidimensional chega a ser atribuído apenas à vertente que apresenta ortogonalidade entre as dimensões, fazendo distinção das outras opções e atribuindo-as o termo acoplamento de colunas (LC-LC).⁴⁶ Na realidade, a cromatografia multidimensional com mecanismos de separação ortogonais descrita acima é nomeada *comprehensive*⁴⁸ e deve preencher três requisitos: todas as partes da amostra são sujeitas a duas separações diferentes; porcentagens iguais (100% ou menores) de todos os componentes da amostra passam através de ambas as colunas e chegam ao detector; a resolução obtida na primeira dimensão é essencialmente mantida. Isso significa que os mecanismos usados nas duas dimensões devem ser diferentes e gerar separações com um adequado grau de ortogonalidade.⁴⁹ Além disso, para manter a eficiência da primeira

dimensão, pelo menos três ou quatro cromatogramas devem ser obtidos na segunda dimensão, cobrindo a largura de cada pico eluído da primeira coluna.

As confusões também ocorrem com o termo acoplamento de colunas. Este é definido como uma forma de *column switching* que usa uma coluna primária conectada à segunda por meio de uma válvula seletora.⁴⁷ Frações da primeira coluna podem ser transferidas para a segunda. Esse termo também pode significar a ligação de duas ou mais colunas em série. No entanto, em outra publicação⁵⁰ os termos *column switching* e acoplamento de colunas são discriminados, o primeiro sendo atribuído particularmente aos tipos de SPE-LC e o último à LC-LC propriamente dita. Na realidade, não existe uma distinção muito grande entre LC-LC e SPE-LC, e muitas vezes as aplicações são difíceis de classificar entre um termo e outro. Além do mais, a definição atribuída para *column switching*, uso de múltiplas colunas conectadas por válvula seletora para melhorar a separação cromatográfica ou limpeza da amostra (*clean-up*), não faz distinção entre SPE-LC e LC-LC.⁴⁷ De fato, cromatografia multidimensional é um termo amplo que pode incluir diversos formatos e aplicações. Os termos acoplamento de colunas e *column switching* têm o mesmo sentido e podem ser usados em acoplamentos LC-LC ou SPE-LC. O que define a especificidade do termo nesse caso é muito mais a finalidade do acoplamento do que as suas características mecânicas, uma vez que são muito similares. Aplicações da cromatografia multidimensional, com diferentes finalidades para a área farmacêutica, são apresentadas em uma revisão de Guttman et al.⁴⁹

Para fazer distinção entre as siglas, a LC multidimensional *comprehensive* utiliza o termo LCxLC (indicando que a separação final obtida é o produto das separações de cada dimensão). O termo LC-LC representa o acoplamento entre colunas de LC em que os picos separados ou frações são direcionados para a outra dimensão. Esse tipo de transferência pode ser do tipo *front-cut*, *heart-cut* ou *end-cut*, significando que a fração transferida corresponde à porção inicial, intermediária ou final, respectivamente, daquilo que está sendo eluído da

primeira coluna. A LC-LC pode ser homomodal ou heteromodal, de acordo com a similaridade ou diferença entre os mecanismos de separação das colunas utilizadas.⁴⁶

Uma distinção importante deve ser feita entre os termos *online* e *at-line*, bem como deve considerar os termos *in-line* e *off-line*. A Figura 1.12 ilustra a diferença entre os termos mencionados acima. O termo SPE-LC é o que mais corretamente aplica-se à abordagem utilizada nessa tese. Esse termo generaliza a utilização de RAM, MIP ou IAE acoplados *online* (ou seja, por meio de válvulas) à LC, com a finalidade de integração entre o preparo de amostras e a separação cromatográfica.

Na busca pela automatização e integração entre preparo de amostras e LC, toda a sequência de SPE *off-line* pode ser realizada por dispositivos robotizados, tais como ASPEC (Gilson), Microlab (Hamilton) e Rapid Trace (Zymark). Alguns desses dispositivos podem ser acoplados *at-line* com a LC, permitindo a injeção do extrato final automaticamente no sistema cromatográfico. A SPE-LC também pode ser acoplada *online* por meio de equipamentos dedicados, tais como Prospekt (Spark Holland) ou OSP-2 (Merck), os quais podem ser programados para efetuar diversas operações, utilizando pequenos cartuchos descartáveis.⁵²

Figura 1.12 Esquema das diferentes formas de integração entre o preparo de amostras e a separação analítica. Adaptado de 51.

O modo *in-line* utiliza as colunas integradas diretamente uma a outra, sem a presença de válvula entre elas. Uma das aplicações encontradas para o modo *in-line* é a utilização de SPE-CE em que o capilar de separação contém em sua porção inicial um segmento preenchido com fase estacionária para extração.^{53,54}

A alternativa aos equipamentos dedicados que utilizam cartuchos descartáveis está na utilização de *column switching* para SPE-LC. Basicamente, uma válvula de seis vias é usada para comutar a pré-coluna extratora da linha de injeção para uma posição entre a coluna analítica e a bomba cromatográfica, na linha de detecção. Na primeira etapa a amostra é injetada e a fase móvel de lavagem elimina os interferentes da matriz, permitindo que os analitos fiquem retidos na pré-coluna. Na segunda etapa a válvula é girada e a fase móvel que condicionava a coluna analítica fica responsável pela eluição e posterior separação dos analitos, levando-os para a detecção. Após a transferência dos analitos o sistema é trazido à disposição inicial e a pré-coluna é condicionada para a injeção subsequente. Existem diversas possibilidades para o preparo de pré-colunas que aceitam injeções repetidas de fluidos biológicos sem tratamento prévio. Anteriormente já se discutiu a possibilidade do uso de colunas com MIP e IAE, bem como de colunas RAM, as quais foram utilizadas nos trabalhos desenvolvidos nos próximos capítulos. Outra abordagem utiliza colunas com partículas maiores (*large particle supports* - LPS) e alta vazão de fase móvel. Acreditava-se que acima de certa vazão o fluxo deixa de ser laminar, passando a ter um comportamento turbulento ao percolar pelo leito da LPS. Essa característica do fluxo permitiria maior transferência de massa, garantindo boa extração dos analitos, ao mesmo tempo em que eliminaria a matriz biológica. Diversas aplicações e revisões são encontradas na literatura, descrevendo o uso de fluxo turbulento em associação com RAM ou LPS.^{31,39,55-57} Entretanto, a existência de fluxo com tal característica para números de Reynolds (*Re*) na ordem de 10 foi refutada por

Hlushkou e Tallarek,⁵⁸ sendo deixado o mecanismo de ação da LPS reduzido a uma simples SPE convencional.

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MINIATURIZADA

A LC miniaturizada tem sua origem histórica no trabalho pioneiro de Horváth et al. em 1967.^{59,60} Esse trabalho surgiu após a miniaturização da cromatografia gasosa por Golay⁶¹ na década anterior, e seguiu as idéias apresentadas nos trabalhos de Giddings.^{62,63} O desenvolvimento da LC miniaturizada foi lento na sua etapa inicial e apenas alguns grupos de pesquisa interessaram-se naquele momento. Ishii et al.⁶⁴ desenvolveram o primeiro trabalho com colunas menores que 1 mm de diâmetro interno (*i.d.*). Ao mesmo tempo o grupo de Scott conseguiu separações altamente eficientes usando colunas com *i.d.* de 1 mm.^{65,66} Esses trabalhos, juntamente com os trabalhos posteriores de Novotny et al.⁶⁷⁻⁶⁹ e Yang,⁷⁰ são considerados chave no desenvolvimento da LC miniaturizada. Posteriormente, os grupos de Novotny^{71,72} e Jorgenson⁷³ inovaram com a utilização de colunas com *i.d.* menores que 100 µm, cuja utilização é, atualmente, mais difundida na área de proteômica.⁷⁴⁻⁷⁸

As principais vantagens da LC miniaturizada são: reduzido consumo de fase móvel e estacionária, utilização de quantidades diminutas de amostras, possibilidade do uso de programação de temperatura e, principalmente, o aumento na sensibilidade com o uso de detectores sensíveis à concentração.⁷⁹⁻⁸³

2.2.1 Nomenclatura

A falta de padronização na terminologia utilizada na LC miniaturizada é um problema que gera muitas confusões sobre o uso de termos tais como micro LC e LC capilar. Várias

publicações revisando a miniaturização da LC apresentam classificações diferentes, sendo algumas não concordantes.^{79,80,82-86} A Tabela 1.3 apresenta uma das classificações mais comumente utilizadas atualmente.⁸⁰ Algumas classificações mais antigas faziam distinção entre os tipos de empacotamento (denso ou frouxo) ou colunas tubulares abertas. Atualmente com a introdução de novos tipos de colunas (monolíticas e empacotadas com partículas pequenas (~1,7 μm)) a possibilidade de classificações fica ainda mais ampla. Apesar da classificação apresentada na tabela abaixo ser limitada frente a todas as possibilidades de construção de colunas que temos atualmente, ela contempla todo o intervalo de dimensões plausíveis.

Tabela 1.3 Nomenclatura para classificação da cromatografia líquida realizada em diferentes escalas

Classificação	Diâmetro interno (<i>i.d.</i>)	Vazão típica
LC convencional	3,2 - 4,6 mm	0,5 - 2,0 mL min ⁻¹
LC <i>microbore</i>	1,5 - 3,2 mm	100 - 500 μL min ⁻¹
micro-LC (μ -LC)	0,5 - 1,5 mm	10 - 100 μL min ⁻¹
LC capilar (cLC)	150 - 500 μm	1 - 10 μL min ⁻¹
nano-LC	10 - 150 μm	10 - 1000 nL min ⁻¹

As colunas convencionais com 4,6 mm de *i.d.* são plenamente estabelecidas. Um degrau abaixo na escala, as colunas *microbore* com 2,1 mm de *i.d.* também foram amplamente adotadas com o advento da LC-MS. Colunas para μ -LC com 1 mm de *i.d.*, não são atualmente tão usadas quanto as duas previamente mencionadas. As características dessa escala já começam a apresentar as peculiaridades da miniaturização, requerendo mais cuidados que as anteriores. No entanto, somente abaixo de ~500 μm é que as características e

vantagens da miniaturização ficam mais marcantes, valendo assim a diferenciação entre μ -LC e LC capilar. Com a modernização da instrumentação, viabilizou-se a implementação mais extensiva de colunas ainda menores. Nesses casos, as vazões são da ordem de nanolitro por minuto, caracterizando-se assim a escala de nano-LC.

2.2.2 Aspectos fundamentais em LC miniaturizada

Apesar das vantagens da LC miniaturizada sobre a escala convencional, é importante destacar a necessidade de um bom conhecimento teórico e de cuidados com o excesso de volume morto em todos os componentes instrumentais e na coluna. A eficiência cromatográfica é relacionada à largura dos picos cromatográficos, a qual é influenciada pela dispersão dos analitos no interior da coluna cromatográfica e fora dela.

Em todos os sistemas cromatográficos, o alargamento da banda cromatográfica deve ser considerado, sendo esse um dos principais fatores responsáveis pela perda da eficiência em um sistema. Na LC miniaturizada, especial atenção tem que ser destinada aos fatores que afetam esse alargamento. Os volumes dos picos eluídos em sistemas miniaturizados são mínimos, sendo muito mais susceptíveis a irregularidades na coluna ou problemas fora dela.

O número aparente de pratos (N_a) expressa a eficiência do sistema cromatográfico, podendo ser descrito, em termos volumétricos, como:

$$N_a = \frac{V_R^2}{\sigma_{total}^2} \quad (1)$$

onde V_R é o volume de retenção do composto e σ_{total}^2 é a variância volumétrica total do pico eluído correspondente.

A variância volumétrica total expressa toda a perda de eficiência devido ao alargamento da banda através de um sistema cromatográfico. Essa perda total corresponde às

contribuições de cada parte do sistema. Como as perdas individuais são consideradas independentes, a variância volumétrica total pode ser escrita como:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{coluna}^2 + \sum \sigma_{extracoluna}^2 \quad (2)$$

onde σ_{coluna}^2 é a variância devido ao alargamento da banda dentro coluna, e os termos $\sigma_{extracoluna}^2$ são relacionados com as diversas fontes de volume morto que alargam os picos fora da coluna.

A diferença entre N e N_a deve ser evidenciada. O número de pratos (N) descreve a eficiência da coluna, e só pode ser obtido se o alargamento extracoluna for eliminado. Assim, a eficiência da coluna pode ser descrita como:

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma_{coluna}^2} \quad (3)$$

2.2.2.1 Atuação da coluna no alargamento da banda cromatográfica

A coluna pode ser considerada a parte mais importante de um sistema cromatográfico. Sabe-se que a vazão usada na coluna tem um efeito direto no valor de σ_{coluna}^2 . Assim, a vazão tem que ser otimizada para a redução do alargamento dos picos no interior da coluna. Uma boa interpretação dos resultados obtidos com um sistema cromatográfico pode ser conseguida com o cálculo dos parâmetros reduzidos (sem dimensão), normalizando a eficiência e a vazão, e permitindo a comparação de colunas de diversos tamanhos e diâmetros de partículas. Dois parâmetros reduzidos são muito utilizados: altura reduzida do prato (h) e velocidade reduzida (v). Assim, a vazão e seu efeito na eficiência são, geralmente, tratados por meio das expressões reduzidas h e v . Os parâmetros reduzidos levam em conta os efeitos do comprimento da coluna, diâmetro das partículas e difusão dos analitos na fase móvel, simplificando a comparação entre colunas diferentes. Adicionalmente, um gráfico h versus v

pode ser construído e ajustado em uma de muitas equações para a altura reduzida do prato (por exemplo, equação de Knox) e, assim, ser usado para determinar as fontes de alargamento da banda cromatográfica. A velocidade reduzida ótima (v_o) para um dado composto pode ser obtida onde o menor valor para altura reduzida do prato (h_m) é encontrado. As vazões usadas em LC freqüentemente correspondem a valores maiores que v_o para se conseguir separações mais rápidas.

A altura reduzida é definida como:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (4)$$

onde H é a altura do prato e d_p é o diâmetro da partícula. Quanto menor o valor de h mais eficiente será a coluna. A velocidade reduzida é definida como:

$$v = \frac{ud_p}{D_m} \quad (5)$$

onde u é a velocidade linear da fase móvel, e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase móvel.^{87,88}

Colunas com 1 a 10 mm de *i.d.* têm os valores reduzidos similares, isto é $h_m \approx 2$ e $v_o \approx 3$, e curvas h vs. v parecidas.⁸⁸ Em geral, para colunas de diâmetros inferiores a 300 μm a altura reduzida ótima do prato diminui e a velocidade reduzida ótima aumenta com a redução do *i.d.*^{71,73} Esse resultado é devido à redução dos termos A e C na equação de Knox:

$$h = Av^{0,33} + B/v + Cv \quad (6)$$

onde os termos A , B e C são a dispersão causada pelo fluxo aleatório, a difusão longitudinal e a resistência à transferência de massa, respectivamente.⁸⁹ Sugere-se que a redução de A e C causada pela diminuição do *i.d.* das colunas capilares é relacionada com três fatores. Esses fatores são redução na inomogeneidade do fluxo, redução na inomogeneidade da retenção no interior da coluna e relaxação difusional (menor tempo gasto para as moléculas do soluto difundirem-se do centro da coluna para próximo da parede).⁷³

2.2.2.2 Influência do volume morto extracolumna no alargamento dos picos

A geometria e o volume do sistema de injeção, o detector, e os tubos e peças de conexão podem contribuir para o alargamento da banda cromatográfica.⁸²

$$\sigma_{extracolumna}^2 = \sigma_{injetor}^2 + \sigma_{conexões}^2 + \sigma_{detector}^2 \quad (7)$$

Dessa forma, uma adequada redução no volume de injeção, nas linhas de conexão, e no volume de detecção é requerida.

A seguir, algumas fórmulas importantes para o cálculo das implicações na redução da escala em LC serão apresentadas e discutidas.^{87,88} A eficiência em LC é baseada no número de pratos (N), e esse está relacionado com h , como apresentado a seguir:

$$N = \frac{L_c}{hd_p} \quad (8)$$

onde L_c é o comprimento da coluna. O volume morto da coluna (V_0) pode ser calculado como:

$$V_0 = \frac{d_c^2 \pi}{4} L_c \varepsilon_{tot} \quad (9)$$

onde, d_c é o diâmetro interno da coluna e ε_{tot} é a porosidade total da coluna. A velocidade linear da fase móvel e a vazão da coluna (F) podem ser definidas como a seguir:

$$u = \frac{vD_m}{d_p} \quad (10)$$

$$F = \frac{ud_c^2 \pi \varepsilon_{tot}}{4} \quad (11)$$

Dessa forma, o tempo de retenção de um composto não retido (t_0) pode ser calculado como $t_0 = l_c/u$, o tempo de retenção (t_R) de um analito com fator de retenção (k) como $t_R = k t_0 + t_0$, e o volume de retenção (V_R) é o produto de F e t_R . A largura do pico (4σ) e o volume do pico (V_p) são apresentados nas equações a seguir:

$$4\sigma = 4 \frac{t_R}{\sqrt{N}} \quad (12)$$

$$V_p = 4\sigma F \quad (13)$$

Com o conhecimento dessas considerações iniciais é possível obter o valor para o maior volume de injeção (V_i) o qual pode ser introduzido sem causar alargamento excessivo do pico cromatográfico. Esse valor é:

$$V_i = \theta V_R \frac{K}{\sqrt{N}} \quad (14)$$

onde, K é um parâmetro característico da qualidade da injeção e geralmente é assumido igual a 2,⁸⁷ e θ^2 define a fração aceitável para o alargamento do pico. Por exemplo, 1% de alargamento ($\theta^2=0,01$) resulta em θ igual a 0,1. De maneira similar o volume máximo aceitável de detecção (V_d) é:

$$V_d = \frac{\theta V_R}{\sqrt{N}} = \frac{V_i}{2} \quad (15)$$

e o comprimento para os tubos capilares de conexão é:

$$l_{cap} = \frac{384\theta^2 D_m V_R^2}{\pi N F d_{cap}^4} \quad (16)$$

Dessa forma, para colunas capilares (*i.d.* de 250 μm), o total de volume morto aceitável pode não ultrapassar a soma de 100 nL.

Complementarmente, é importante destacar que, apesar da afirmação de que a LC miniaturizada representa um aumento na sensibilidade, isso é verdadeiro somente se a eficiência cromatográfica for mantida e se volumes proporcionalmente maiores de amostra forem injetados no sistema miniaturizado. A última condição, apesar de uma vantagem em situações de volume restrito de amostra disponível, implica que volumes maiores que os aceitáveis para a LC miniaturizada sejam necessários para um real aumento na sensibilidade. Ou seja, considerando-se o fator de proporcionalidade entre as escalas convencional e capilar

$(r_{conv}^2/r_{capilar}^2)$ é necessário um aumento relativo no V_i . Assim sendo, a única estratégia para realmente carregar um volume maior de amostra e, conseqüentemente, de massa do analito na coluna capilar, é a focalização após a injeção. Essa estratégia foi revisada por Vissers et al.⁸⁶ e os dois modos apresentados foram a focalização no topo da coluna analítica ou a utilização de *column switching*. Esse último, apesar de ser ligeiramente mais complexo, permite melhor integração da etapa de preparo de amostras. Nesses modos, a amostra deve ser aquosa, assim como a fase móvel, fazendo com que os analitos presentes na amostra sejam comprimidos no início da coluna e, então, eluídos quando uma fase móvel mais forte for utilizada.

2.2.3 Instrumentação

Conforme mostrado na seção anterior, quando o diâmetro da coluna é reduzido, todo o resto do sistema (bombas, misturadores, injetor, detector e conexões) também tem que ser adaptado. Em 1997, Vissers et al.⁸⁴ revisaram a instrumentação, detecção e aplicações da LC miniaturizada; posteriormente Vissers⁷⁹ revisitou o assunto, trazendo algumas atualizações e novas discussões.

2.2.3.1 Sistema de propulsão da fase móvel

Em LC capilar com colunas empacotadas, a vazão típica fica entre 1 e 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Essas baixas vazões dificilmente são fornecidas adequadamente por bombas convencionais. Com o desenvolvimento da LC miniaturizada bombas mais apropriadas têm surgido (tanto do tipo seringa quanto do tipo reciprocante). Outra alternativa, com bombas convencionais, é a utilização de um divisor de fluxo (*splitter*), por meio da introdução de um conector em “T”. Nesse caso, a seleção adequada do *i.d.* e do comprimento do capilar de divisão é que controla

a razão entre a vazão da coluna e a vazão desviada. Alternativamente, um processador de microfluxo pode ser utilizado controlando, automaticamente, a divisão do fluxo e garantindo uma vazão constante, mesmo com variações na queda de pressão através da coluna. Uma opção para separações isocráticas é a utilização de bombas convencionais em modo de pressão constante. Nesse caso, a pressão adequada para garantir a vazão desejada é ajustada e mantida constante durante toda a separação. Uma última consideração importante sobre o sistema de propulsão de fase móvel é relativo ao volume do misturador. Em separações por gradiente, para garantir uma estabilidade e eficiência adequada do sistema, os solventes têm que ser suficientemente misturados. Para isso, misturadores causam turbulência na região de confluência dos solventes, garantindo que a mistura efluente seja homogênea. O volume dos misturadores convencionais frequentemente supera 1 mL. Em cLC, volumes dessa ordem podem causar um atraso de mais de 1 hora no gradiente desejado; assim, volumes em torno de 2 μ L devem ser utilizados para a mistura de gradientes em colunas capilares empacotadas.

2.2.3.2 Injetor

Para colunas capilares empacotadas, volumes de injeção de poucos nanolitros até menos de 0,1 μ L são necessários. O maior volume de injeção suportado pela coluna, sem causar alargamento dos picos, pode ser calculado com a equação 14. Atualmente existem válvulas comerciais com alça de amostragem interna que podem chegar a tais volumes. Outra possibilidade é a utilização de um injetor convencional, com divisão do fluxo direcionado para a coluna, após a válvula. Finalmente, a estratégia que apresenta mais vantagens, é a utilização de injeção de grandes volumes com focalização dos analitos, como já mencionado anteriormente.

2.2.3.3 Detector

Os detectores mais comumente usados em combinação com a cLC com colunas empacotadas são: absorbância UV/Vis, MS, eletroquímico e fluorescência. Nessa tese foram usados os detectores UV e *electrospray*-MS (ESI-MS), especialmente por se comportarem como detectores sensíveis à concentração nas aplicações miniaturizadas. Para o detector UV não causar alargamento dos picos, a cela de detecção não pode ultrapassar o volume indicado pela equação 15. Para isso, uma das opções é a utilização da detecção *on-column* abrindo-se uma janela de detecção na película de poliimida que reveste o capilar de sílica fundida. Essa abordagem garante que não haja alargamento dos picos em uma cela de detecção. Por outro lado, a sensibilidade fica prejudicada devido ao caminho ótico de detecção ser apenas o *i.d.* da coluna. Uma tentativa de contornar a desvantagem da sensibilidade é a utilização de celas em “U” ou “Z”, para aumentar o caminho ótico. Essas celas são disponíveis comercialmente em diversas dimensões e para detectores de vários fabricantes. O custo de aquisição é um dos fatores limitantes e os ganhos de sensibilidade, apesar de bem maiores que os da detecção *on-column*, não se comparam àqueles da detecção por ESI-MS. O uso do MS, como um detector altamente seletivo para a cLC é uma das melhores opções. O ESI-MS, particularmente, apresenta grande compatibilidade com baixas vazões de fase móvel, como será discutido posteriormente. Entretanto, como ocorre nas outras escalas, o uso de soluções tampão constituídas de sais não voláteis causam problemas também na escala capilar.

2.2.4 Técnicas para preparo de colunas

Atualmente, há uma enorme variedade de colunas comerciais disponíveis para HPLC e cLC. Porém, esse fator não impede que colunas com desempenho satisfatório sejam

empacotadas no próprio laboratório. Existem diferentes técnicas utilizadas no empacotamento de colunas para HPLC, cada qual com suas vantagens, desvantagens e limitações. Encontram-se na literatura trabalhos utilizando empacotamento por *slurry*, compressão radial dinâmica, empacotamento a seco com gás (*dry packing*), compressão axial dinâmica e fluido supercrítico.⁹⁰⁻⁹²

O empacotamento por *slurry* consiste da pressurização de uma suspensão do material de empacotamento para o interior da coluna, por bomba de alta pressão que impulsiona um solvente adequado. O empacotamento por compressão axial consiste de uma espécie de seringa, cujo embolo pressuriza uma suspensão espessa do material de empacotamento para o interior do tubo. O empacotamento por compressão radial consiste de um tubo que desliza internamente ao tubo da coluna cromatográfica e que dispensa, sob pressão, o material de empacotamento em sentido radial. O empacotamento por fluido supercrítico utiliza CO₂ no estado supercrítico para carregar o material de empacotamento para o interior do tubo.^{90,93}

De modo geral, o empacotamento por *slurry* é o mais utilizado para empacotamento de colunas convencionais ou capilares. Empacotamentos por compressão radial e axial são mais aplicados na construção de colunas para HPLC preparativo, embora haja citações do uso de compressão radial para colunas analíticas. Normalmente, o empacotamento por fluido supercrítico aplica-se à construção de colunas de *i.d.* menor que 1 mm, devido a limitações da pressurização de grandes volumes de CO₂.⁹⁰ Da mesma forma, *dry packing* aplica-se preferencialmente a colunas capilares. Nas partes experimentais dos Capítulos 3 e 4 maiores detalhes são fornecidos sobre o preparo de colunas capilares empacotadas.

Tubos de sílica fundida são comumente usados no preparo das colunas. Eles são flexíveis e convenientes para manipulação, além disso, a transparência da parede do tubo facilita a inspeção do empacotamento. Outros tipos de tubo também podem ser usados, por

exemplo, tubos de poliéter éter cetona (PEEK), aço inoxidável e desses dois materiais revestidos internamente por sílica fundida.

3 LC-MS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

Um espectrômetro de massas é um instrumento desenhado para separar espécies carregadas de acordo com suas razões massa-carga (m/z) (ou outras propriedades, tais como a energia cinética ou o momento dos íons) e determinar suas intensidades. Assim, um instrumento típico é constituído de diversas partes: interface de ionização, analisador de massas, detector e sistema de processamento dos dados. A resolução de massas do MS é muito útil para melhorar a seletividade da separação cromatográfica. Além disso, melhor detectabilidade pode ser obtida pela redução do ruído da linha de base, aumentando a razão sinal-ruído (S/N). O acoplamento LC-MS já foi revisado diversas vezes enfocando diferentes aspectos e seguindo a evolução do estado da arte.⁹⁴⁻⁹⁸ Em contraste, o conteúdo aqui revisado é focalizado apenas nos principais aspectos instrumentais e práticos das aplicações para análise de fármacos em fluidos biológicos, especialmente aqueles envolvidos nos trabalhos científicos resultantes dessa tese.

3.1 IONIZAÇÃO DOS ANALITOS

No acoplamento com a cromatografia líquida, a fase móvel proveniente da coluna analítica é direcionada para o espectrômetro de massas. Geralmente ela é introduzida *online* no sistema, através de uma conexão de entrada adequada. Para que o espectrômetro de massas possa reconhecer os analitos presentes na amostra, uma técnica de ionização tem que ser

empregada, uma vez que o espectrômetro tem capacidade de analisar apenas espécies carregadas. Há diversas técnicas de ionização, dependendo da natureza dos analitos e da fase móvel de separação utilizada. As técnicas mais bem sucedidas no acoplamento com a cromatografia líquida são aquelas que utilizam interfaces de ionização à pressão atmosférica (API). Elas contrastam com as técnicas de ionização à baixa pressão, visto que a fase líquida quando vaporizada produz uma quantidade considerável de gás para ser facilmente eliminada pelo sistema de vácuo desses tipos de interface.⁹⁹ Mais uma diferença é a suavidade com que as técnicas API geram/transferem os íons, permitindo que moléculas frágeis atinjam a fase gasosa predominantemente na forma intacta.

A maioria dos fármacos é constituída de moléculas com caráter básico e outra parcela considerável de moléculas com caráter ácido. Assim, a técnica de ionização por ESI, bem como a sua variação com assistência pneumática, algumas vezes diferenciada com o nome de *ion spray*, são as mais utilizadas em aplicações para a análise de fármacos.

3.1.1 Ionização por *electrospray* (ESI)

ESI é, basicamente, uma técnica de transferência dos analitos de uma fase líquida para a fase gasosa. Ela é, para a maioria das moléculas, a técnica mais amena de ionização e, geralmente, é bem sucedida com moléculas iônicas de polaridade mediana. Adicionalmente, ESI produz com frequência íons com múltiplas cargas para moléculas grandes, tais como peptídeos e proteínas. Fenn et al.^{100,101} foram os primeiros a descrever a utilização do ESI como ferramenta para o acoplamento LC-MS à pressão atmosférica. Posteriormente, em 1987, Henion et al.¹⁰² relataram o uso de assistência pneumática para facilitar a utilização do ESI com vazões mais altas de fase móvel (*ion spray*). Em 2002, em conjunto com outros achados na área de espectrometria de massas (MALDI) e NMR, Fenn foi laureado com o Nobel de

Química por suas descobertas e trabalhos com ESI. Nas últimas décadas ESI tem se tornado a mais importante técnica de ionização em uso.

Os mecanismos do ESI ainda estão sob estudo, e não são totalmente compreendidos. Um campo elétrico é aplicado entre o líquido que flui por um capilar e um contra-eletrodo, causando a separação dos íons com carga positiva e negativa e formando uma dupla camada de íons no menisco do líquido. A atração eletrostática dos íons em excesso na camada exterior do líquido, em direção ao contra-eletrodo, causa uma distorção da sua superfície no formato de um cone (chamado cone de Taylor). Ao mesmo tempo, a tensão superficial do líquido atua para manter a superfície não deformada. A partir de certa voltagem a tensão superficial não é mais capaz de reter a superfície coesa e um fino filamento líquido alonga-se do cone de Taylor, emitindo um jato de gotículas carregadas em direção ao contra-eletrodo. À medida que as gotículas viajam em direção ao contra-eletrodo o solvente tende a evaporar, aumentando a sua razão carga-volume. Quando a repulsão das cargas ultrapassa a força da tensão superficial das gotículas a fissão coulômbica passa a ocorrer e gotículas menores são ejetadas das gotículas iniciais. O processo pelo qual os íons chegam à fase gasosa tem sido debatido, e atualmente ainda não se conhece todos os detalhes desse processo. Basicamente dois mecanismos tentam explicar a obtenção dos íons isolados em fase gasosa. No modelo da carga residual (do inglês *charge residue model* – CRM) introduzido por Dole et al.,¹⁰³ assume-se que as gotículas vão dividindo-se e ficando menores, até que somente reste o íon dessolvatado. Já no modelo da evaporação do íon (do inglês *ion evaporation model* – IEM) proposto por Iribarne e Thomson,^{104,105} assume-se que íons dessolvatados são emitidos da superfície de gotículas carregadas de pequeno diâmetro. Alguns trabalhos propõem que a teoria envolvida no modelo CRM é válida predominantemente para macromoléculas,¹⁰⁶ enquanto a do modelo IEM aplica-se mais para pequenas moléculas ionizadas.¹⁰⁷ No trabalho de Enke uma discussão dos mecanismos existentes é apresentada e um modelo baseado em

Figura 1.13 Esquema da formação do *electrospray* no modo positivo. Adaptado de 108.

equilíbrio é desenvolvido para explicar a abundância dos íons obtidos na fase gasosa.¹⁰⁹ De fato, o que importa no acoplamento LC-MS é que, para uma ampla gama de compostos, os íons expressados na fase gasosa são um reflexo do que está presente na fase líquida proveniente da coluna cromatográfica. A Figura 1.13 esquematiza a formação de um ESI em modo de ionização positivo.

Um fato que deve ser mencionado é a limitação à constituição da fase móvel utilizada em LC. Sais pouco voláteis não podem ser usados e outros aditivos tem que ser cuidadosamente considerados para evitar condições desvantajosas para a ionização dos analitos. Apesar disso, a confiabilidade da seletividade acrescentada pelo MS não pode ser rejeitada por causa dessa incompatibilidade. Ademais, uma forma de contornar os problemas causados pela necessidade de utilizar fases móveis pouco compatíveis com ESI-MS é a introdução de um solvente adicional após a separação. Esse solvente pode ser introduzido por infusão em “T” após a coluna ou na forma de *sheath liquid* ao redor da fase móvel de separação, compatibilizando-a, em certos casos, com a ESI.

3.1.2 Ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI)

No trabalho realizado nessa tese utilizou-se a ESI, contudo outras técnicas API estão disponíveis e devem ser mencionadas. As técnicas de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI) possuem um aspecto muito mais complementar do que competitivo, com relação à ESI. De maneira simplificada, em ambas as técnicas a solução proveniente do HPLC é nebulizada e vaporizada através de uma região aquecida. As moléculas livres do analito são então ionizadas pelas espécies carregadas produzidas na fase gasosa, pela descarga corona no caso do APCI ou por fótons altamente energéticos gerados por uma lâmpada UV no caso do APPI.

3.2 EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL

Quanto à sensibilidade, existem dois tipos de detectores. Detectores sensíveis à concentração respondem à concentração do analito na solução que chega ao detector. Assim, a altura máxima do sinal é proporcional à concentração do analito no máximo do pico cromatográfico. Detectores sensíveis ao fluxo de massa, por sua vez, são sensíveis ao produto da concentração e vazão que chega ao detector. A espectrometria de massas é inerentemente uma técnica de detecção sensível ao fluxo de massa.¹¹⁰ Por exemplo, ionizações por impacto de elétrons (EI) e APCI são tipicamente sensíveis ao fluxo de massa dos analitos que chegam ao espectrômetro. Por outro lado, ESI comporta-se mais como um detector sensível à concentração. Dependendo da faixa de vazão e do desenho da interface utilizada alguma influência da vazão pode estar presente; contudo, na maioria das aplicações utilizando LC miniaturizada o seu comportamento é predominantemente independente da vazão.¹¹¹⁻¹¹³

Um extensivo estudo realizado por Ikonomou et al.¹¹⁴ apresenta a comparação entre os modos ESI puro e *ion spray* e, entre outros parâmetros, avalia a influência da vazão sobre a resposta obtida.

A vantagem da miniaturização da LC com detectores sensíveis à concentração já foi discutida em uma seção anterior. Adicionalmente, ESI é altamente compatível com vazões na ordem de poucos microlitros por minuto e o ESI-MS comporta-se como sensível à concentração em tais valores.¹¹⁵ A eficiência do ESI é elevada quando gotículas carregadas de menor diâmetro (típicas de baixas vazões) são formadas e atingem o *electrospray*.¹¹⁶ Nesse caso, a liberação de íons para a fase gasosa é mais efetiva e melhores resultados são obtidos. Por exemplo, o efeito da matriz sobre a ionização por ESI, causando supressão, já foi bem demonstrado quando preparo de amostras insuficiente é realizado.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Por outro lado, nos sistemas miniaturizados uma menor supressão pela matriz pode ser obtida devido às melhores características da formação do ESI.

3.2 ANALISADORES PARA MS

Diversos analisadores de massas estão disponíveis atualmente e a escolha do analista depende do tipo de aplicação desejada e das características dessa demanda. Aspectos tais como intervalo de massas, poder de resolução, exatidão de massa, taxa de transmissão dos íons e sensibilidade, quantificação, velocidade de varredura, bem como facilidade de acoplamento com o sistema de separação devem ser considerados. As opções para escolha incluem analisadores de massas do tipo quadrupolo (Q), *ion trap* (aprisionador de íons) 2D e 3D, tempo de voo (ToF), setores do tipo elétrico e magnético, e equipamentos com transformada de Fourier do tipo ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) e *orbitrap*.^{120,121} Além dessas, há a possibilidade de combinação de mais de um analisador para obtenção de

análise em *tandem* no espaço, quer seja com acoplamento de analisadores do mesmo tipo (ex. triplo quadrupolo) ou com equipamentos híbridos (ex. Q-ToF).¹²² Adicionalmente, alguns equipamentos do tipo *ion trap* permitem a fragmentação e isolamento de íons de interesse sucessivas vezes, operando no modo chamado *tandem* no tempo. Várias publicações sobre as características dos diferentes analisadores e suas principais aplicações encontram-se disponíveis.¹²³⁻¹²⁵ Nos trabalhos descritos nessa tese os analisadores quadrupolares (simples e triplo) foram utilizados e serão brevemente discutidos.

O analisador do tipo quadrupolo consiste de quatro hastes simetricamente arranjadas às quais é aplicado um potencial alternado por rádio frequência (RF) sobreposto a um potencial de corrente contínua (DC). Pela interação desses potenciais aplicados, um campo elétrico é criado, estabilizando os íons axialmente introduzidos no centro do quadrupolo, de acordo com suas m/z . Assim, dependendo da intensidade e frequência das voltagens aplicadas, diferentes m/z podem ser filtradas através do quadrupolo. Íons estabilizados irão oscilar harmonicamente em um movimento complexo perpendicularmente as hastes do quadrupolo e sendo mantidos em posição central irão atravessar o filtro de massas, enquanto que os íons não estabilizados pela escolha dos potenciais irão oscilar erraticamente e atingir as hastes do quadrupolo, não sendo transmitidos através dele.¹²⁶ A Figura 1.14 ilustra a trajetória dos íons estabilizados e não estabilizados através do quadrupolo.

Figura 1.14 Feixe de íons inserido no analisador quadrupolar demonstrando a transmissão dos íons estabilizados (M_1) e a desestabilização dos íons não desejados no momento (M_2 e M_3). Adaptado de 126.

A Figura 1.15 descreve o arranjo dos potenciais aplicados nas hastes do quadrupolo. Um par oposto de hastes tem o potencial aplicado igual a $+(U+V\cos\omega t)$ enquanto o outro par tem ele igual a $-(U+V\cos\omega t)$. U é um potencial fixo aplicado e $V\cos\omega t$ representa um potencial alternado por rádio frequência com amplitude (V) e frequência (ω). Dessa forma $\cos(\omega t)$ alterna o potencial aplicado, em função do tempo, sobre os pares de hastes (A e B), como apresentado na Figura 1.16.

Figura 1.15 Vista da secção perpendicular das hastes do quadrupolo. Um potencial positivo, $+(U+V\cos\omega t)$, é aplicado a um par de hastes opostas (A) e um potencial negativo, $-(U+V\cos\omega t)$, é aplicado a um par de hastes (B). As linhas tracejadas indicam os planos em que o campo elétrico resultante é igual a zero. Os eixos x e y são indicados e o eixo z está posicionado perpendicularmente ao plano do papel. Adaptado de 126.

Figura 1.16 Variação do potencial total aplicado em função do tempo em cada par de hastes (A – linha contínua e B – linha tracejada). Nessa representação os potenciais aplicados U e V são respectivamente iguais a 1000 V e 6000 V e a RF é ω . Adaptado de 126.

Nos sistemas do tipo “triplo” quadrupolo (QqQ) um analisador quadrupolar é acoplado a uma câmara de colisão preenchida com um gás inerte (geralmente um quadrupolo, hexapolo ou octapolo operando apenas em modo RF), a qual é, em seguida, conectada a um segundo analisador quadrupolar. Nessa câmara os íons provenientes do primeiro analisador, se acelerados com energia suficiente, podem fragmentar-se ao colidirem com as moléculas inertes do gás. A esse tipo de reação dá-se o nome de fragmentação induzida ou ativada por colisão (do inglês *collisional induced dissociation* – CID ou *collision-activated dissociation* – CAD). Os íons secundários obtidos pelos processos de fragmentação podem então ser filtrados pelo segundo quadrupolo, conferindo maiores informações estruturais e aumento de seletividade para a espectrometria de massas. Esse aumento de seletividade é muito útil para aumentar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos para a determinação de fármacos em amostras complexas. A Figura 1.17 apresenta o tipo de reação e seleção de íons que ocorre nos equipamentos com dois analisadores quadrupolares em *tandem*.

Figura 1.17 Princípio de operação de um equipamento com dois analisadores quadrupolares em *tandem*.

A Tabela 1.4 resume os modos de operação de um instrumento do tipo triplo quadrupolo. Entre outras utilidades, o modo de operação para obtenção de íons filhos ou produtos é importante para determinação do perfil de fragmentação dos compostos de interesse. O modo para obtenção do espectro dos íons pais ou precursores é interessante quando um determinado fragmento ionizado é esperado para algum composto ou grupo de compostos de interesse. O modo de perda neutra serve para a identificação de compostos que tenham seus produtos ionizados da fragmentação relacionados com a perda neutra de uma determinada massa constante. Por exemplo, pode funcionar para a identificação de moléculas fosforiladas, glicosiladas, ou produtos de biotransformação conjugados que perdem esses grupos na forma neutra durante a fragmentação. O modo de monitoramento de reações múltiplas (do inglês *multiple reaction monitoring* (MRM)) permite a observação de transições específicas provenientes da fragmentação de um determinado íon de interesse em fragmento particular. Esse é o principal modo utilizado na determinação e quantificação de compostos conhecidos de interesse, uma vez que confere seletividade e excelente detectabilidade, reduzindo amplamente o ruído da linha de base, e elevando assim a S/N.

Tabela 1.4 Modos de operação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.

	MS1	Cela de colisão	MS2
Espectro dos íons filhos	precursor	RF apenas	varredura
Espectros dos íons pais	varredura		produto
MRM	precursor		produto
Perda neutra	sincronizado c/ MS2		sincronizado c/ MS1

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Quando um método bioanalítico é desenvolvido deve-se providenciar sua adequada validação para que ele possa ser aplicado na rotina de um laboratório. Recomendações gerais para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos podem ser obtidos da *Food and Drug Administration* (FDA),¹²⁷ *International Conference on Harmonisation* (ICH),¹²⁸ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),¹²⁹ além da existência de diversas publicações científicas sobre o assunto.¹³⁰⁻¹³⁴ De acordo com o FDA a validação assegura o adequado desempenho analítico do método e pode incluir vários parâmetros fundamentais, tais como os citados a seguir: exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, linearidade e estabilidade.¹²⁷ Alguns aspectos relevantes desses parâmetros serão brevemente abordados a seguir.

Os valores de aceitação para os parâmetros de validação (precisão e recuperação, por exemplo) são geralmente predefinidos pelas regulamentações. Contudo, um trabalho de González e Herrador,¹³⁵ publicado recentemente, descreve um guia prático de validação, no qual alguns intervalos de aceitação são assumidos de acordo com o nível de concentração enfocado. As Tabelas 1.5 e 1.6 reproduzem os intervalos de aceitação indicados nessa publicação.

Tabela 1.5 Percentagem de recuperação aceitável dependendo do nível de concentração do analito.

Analito (%)	Fração do analito	Unidade	Intervalo de recuperação (%)
100	1	100%	98-102
10	10^{-1}	10%	98-102
1	10^{-2}	1%	97-103
0,1	10^{-3}	0,1%	95-105
0,01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0,001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0,0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0,00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0,000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

Tabela 1.6 Percentagens de RSD aceitáveis obtidas pela função de Horwitz e do programa *Peer Verified Methods* (PVM) da AOAC para diferentes níveis de concentração dos analito.

Analito (%)	Fração do analito	Unidade	Horwitz % RSD	AOAC PVM % RSD
100	1	100%	2	1,3
10	10^{-1}	10%	2,8	1,8
1	10^{-2}	1%	4	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	5,7	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm	8	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm	11,3	7,3
0,0001	10^{-6}	1 ppm	16	11
0,00001	10^{-7}	100 ppb	22,6	15
0,000001	10^{-8}	10 ppb	32	21
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	45,3	30

4.1 EXATIDÃO E PRECISÃO

Exatidão é o parâmetro que define a proximidade entre o valor medido e o valor real aceito para uma determinada amostra, sendo determinado pela medida em replicatas de uma amostra com concentração conhecida. Segundo alguns órgãos a exatidão deve ser determinada pela análise de 3 a 5 replicatas de uma mesma concentração em pelo menos 3 concentrações diferentes, cobrindo todo o intervalo de concentrações especificado para a validação em questão. Ela pode ser determinada numericamente por meio da inexactidão, ou seja, da distância entre o valor medido e o valor real. Um valor percentual de *bias* é uma das formas da representação dessa medida e pode ser calculado para cada ponto como sendo $((\text{valor medido} - \text{valor real}) / \text{valor real}) \times 100$. Valores dentro de $\pm 15\%$ são aceitos para todos os níveis, exceto para o limite de quantificação (LQ), para o qual se aceita $\pm 20\%$. O ideal na avaliação da exatidão seria a utilização de materiais certificados. Outra forma é a comparação com os resultados fornecidos por outra técnica analítica confiável e com metodologia validada. Finalmente, quando isso não é possível, uma forma aceita por alguns é a fortificação de uma matriz branca com quantidade conhecida do analito; a confiabilidade desse estudo pode ser aumentada realizando um ensaio cego, no qual a pessoa que faz a determinação não tem conhecimento da quantidade de analito adicionada.

Precisão descreve a amplitude da distribuição de resultados produzidos aleatoriamente pelo sistema. Em outras palavras, é a concordância entre múltiplas medidas de uma única e homogênea amostra. A precisão pode ser dividida em categorias e diferentes publicações seguem nomenclaturas um pouco divergentes. Uma das formas mais consensuais atualmente é dividir a precisão em repetibilidade (ou precisão intra-ensaio), precisão intermediária (ou inter-ensaios) e reprodutibilidade. Uma das formas de realizar essa determinação é pelo cálculo do desvio padrão relativo percentual (% RSD) de cinco replicatas medidas em três

níveis de concentração diferentes e cobrindo o intervalo de linearidade. Para a precisão intermediária geralmente consideram-se medidas nas quais se avalia a influência de variações do equipamento utilizado, analista, e/ou dia de análise. Reprodutibilidade é um parâmetro mais comumente associado com variações entre laboratórios. A forma pela qual esses parâmetros foram obtidos em cada trabalho dessa tese está descrita nos seus respectivos capítulos.

4.2 RECUPERAÇÃO

Recuperação é tradicionalmente um parâmetro incluído na validação dos estudos. Apesar de ser menos crucial sobre o desempenho de determinadas aplicações, esse parâmetro ainda é muito importante para o reconhecimento geral sobre o que está acontecendo com o método. Em algumas aplicações de rotina, ainda hoje se confia apenas nesse teste para assegurar a inexistência de interferência da matriz. Nesses casos, se o teste de recuperação retorna um resultado aceitável (muitas vezes entre 70 e 120%), o método é calibrado usando soluções dos padrões preparados em água ou outra solução bem definida, e então é aplicado para a determinação do(s) analito(s) em amostras reais. Entretanto, sabe-se atualmente que a melhor forma de calibração é baseada no preparo dos calibradores na matriz mais similar possível à da amostra real. Uma vez considerada a interferência da recuperação na performance do método, mesmo valores de recuperação bem inferiores aos comumente preconizados não são necessariamente fatores que inviabilizam uma validação. Desde que uma recuperação baixa seja reprodutível, ela terá o mesmo peso em todos os experimentos e resultará em valores confiáveis. O único parâmetro indiscutivelmente influenciado diretamente pela recuperação é o fator de concentração obtido, o qual considera a razão entre o volume da amostra e o volume final do extrato, e a recuperação promovida pelo método.

A recuperação pode ser dividida em absoluta e aparente (ou relativa). A recuperação absoluta é medida como a razão entre a quantidade de analito extraída pelo método proposto e a quantidade de analito presente em uma solução a qual não foi submetida ao processo de extração. Por outro lado, a recuperação aparente compara a quantidade de analito extraída de uma amostra contendo matriz e a quantidade extraída de uma solução simples (geralmente água) que contém o analito. Por exemplo, esse tipo de recuperação pode ser obtido pela razão entre a resposta da extração de um determinado analito fortificado em plasma e a resposta da extração da mesma concentração do analito fortificada em água.

4.3 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Algumas vezes pode haver confusão sobre se usar o termo específico ou seletivo em respeito a um método.¹³⁶ Por definição um método é específico se somente mede a quantidade do analito em questão, sem receber a influência de nenhum tipo de interferente. Para ser seletivo, um método deve realizar uma análise sem ser influenciado pelos possíveis interferentes. Enquanto a especificidade é um termo absoluto (o método é específico, ou não o é), a seletividade pode ser graduada em uma escala que define se um método é mais ou menos seletivo. Independente de definições, a seletividade de um método é importante parâmetro, pois pode inviabilizar a aplicabilidade de um método em uma determinada situação. Para técnicas cromatográficas, uma forma de avaliar a seletividade é pela presença de picos interferentes no tempo de retenção dos compostos de interesse. Geralmente, em análises de fluidos biológicos, se aceita como prova de seletividade a análise de seis amostras brancas de origens diferentes que não apresentem picos nos tempos de retenção esperados para os analitos. Análises por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) geralmente são consideradas capazes de gerar respostas seletivas. Contudo, em situações muito complexas, a

observação de múltiplas transições de MRM, bem como a razão entre elas, pode aumentar ainda mais a seletividade.

4.4 SENSIBILIDADE E DETECTABILIDADE

Matematicamente a sensibilidade de um método é definida pela inclinação da reta que tangencia as respostas produzidas por crescentes concentrações dos analitos. Dessa forma, quanto maior o incremento do sinal analítico promovido por um determinado incremento de concentração, maior a sensibilidade do método. No entanto, muitas vezes esse termo é erroneamente utilizado para referir-se aos menores níveis de concentração que podem ser determinados ou observados por um método. O termo detectabilidade é muito mais apropriado a essa situação que o termo sensibilidade.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração capaz de ser distinguida do ruído da linha de base, podendo ser atribuída a valores com S/N maior que 2 ou 3. O LQ é o valor que realmente importa no momento de definir a qualidade do método proposto, sendo definido como a menor concentração determinada com um nível de confiança adequado. Ele geralmente é atribuído, em cromatografia, a picos com S/N maior que 5 ou 10 e com precisão e exatidão melhores que 20%.

4.5 ESTABILIDADE

A estabilidade do analito submetido a diversas condições deve ser conhecida. É importante avaliá-la em todas as condições encontradas da amostragem à análise. A extensão e o tipo de teste necessário são definidos pelas agências reguladoras, e variam de acordo com a característica da análise. Alguns testes de estabilidade que podem ser requeridos são:

estabilidade do analito em matriz a longo prazo em condições de estoque; estabilidade do analito em matriz a curto prazo em condições de análise; estabilidade da solução estocada sob diferentes condições (temperatura, cor do frasco, etc.); estabilidade do analito após o preparo da amostra; estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

4.6 CALIBRAÇÃO E INTERVALO DE LINEARIDADE

A linearidade de um método é a habilidade em descrever a relação entre a função de resposta (y) e a concentração (x). Pelo menos 5 a 6 calibradores fortificados em matriz biológica e analisados em duplicata (no mínimo) são sugeridos para o levantamento da curva de calibração. Adicionalmente recomenda-se a análise de uma amostra de concentração zero adicionada do padrão interno e de uma amostra branca (sem o padrão interno). A resposta pode ser diretamente relacionada com a concentração, ou tratada por transformações matemáticas bem definidas. O cálculo da regressão linear por mínimos quadrados é a forma mais comum de obtenção da função que relaciona a resposta medida e a concentração de interesse. Em aplicações com um amplo intervalo de concentrações, geralmente regressões ponderadas ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$, por exemplo) resultam em melhor representação dos resultados.^{137,138} O assunto calibração isoladamente chama grande atenção e diversas publicações já abordaram diferentes aspectos dele, por exemplo, padronização interna e número de pontos da curva analítica.¹³⁹⁻¹⁴³ O mais importante a ser destacado é a forma de determinar-se o intervalo de linearidade. Erroneamente considera-se apenas um ajuste adequado, fornecido pelo coeficiente de correlação (r), como ferramenta para avaliar a linearidade do intervalo de concentrações estudado. A revisão de Burke¹³⁹ demonstra que apenas um alto valor de r não significa, necessariamente, que a distribuição dos resultados é linear. O Comitê de Métodos Analíticos (AMC) da Sociedade Real Britânica de Química

(*Royal Society of Chemistry* – RSC) publicou uma nota sobre como avaliar a linearidade da calibração.^{144,145} Adicionalmente, um dos métodos mais aceitos para a rápida avaliação da distribuição linear dos resultados é o cálculo e construção do gráfico de resíduos.¹³⁹ Além dessa, outra forma de avaliar a linearidade é comparar estatisticamente a semelhança entre um ajuste linear e um ajuste não-linear (quadrático, por exemplo).¹⁴¹

5 FÁRMACOS DE INTERESSE NOS ESTUDOS REALIZADOS

5.1 ANTIDEPRESSIVOS

A depressão e outros distúrbios relacionados têm se tornado um importante problema de saúde pública. A terapia farmacológica é uma das formas mais bem sucedidas para o restabelecimento da qualidade de vida dos indivíduos afetados por transtornos depressivos. Contudo, é importante o correto ajuste da terapia, incluindo escolha do antidepressivo adequado e dosagem prescrita. Efeitos adversos, ou ausência de efeitos benéficos são alguns dos principais motivos para o abandono de um tratamento fármaco-terapêutico.¹⁴⁶

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) e, mais recentemente, os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI) têm merecido destaque no tratamento da depressão. Os TCAs inibem, por mecanismo não completamente entendido, preferencialmente a recaptação de noradrenalina, no caso das aminas secundárias, e serotonina, no caso das aminas terciárias. Os antidepressivos estudados nos trabalhos dessa tese foram desipramina (DES), nortriptilina (NOR), imipramina (IMI), amitriptilina (AMI), clomipramina (CLO) e fluoxetina (FLU). Todos eles apresentam um grupo amina,

Figura 1.18 Estrutura química dos fármacos antidepressivos estudados. (A) desipramina, (B) nortriptilina, (C) imipramina, (D) amitriptilina, (E) clomipramina e (F) fluoxetina.

conferindo-os valores de pK_a entre 8,7 e 10,2, além disso, apresentam alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas. Seus níveis terapêuticos estão geralmente entre 50 e 300 ng mL^{-1} , e níveis de detecção tão baixos quanto 1 ng mL^{-1} podem ser requeridos em estudos farmacocinéticos após dose única de alguns desses compostos. A Figura 1.18 apresenta a estrutura química dos antidepressivos estudados nessa tese.¹⁴⁷⁻¹⁵¹

5.2 ANTI-HELMÍNTICOS

O albendazol (ALB) é mundialmente conhecido pelo tratamento eficaz contra parasitoses. Ele tem provado ser efetivo no tratamento da neurocisticercose em humanos e bovinos, um problema que atinge muitos países da América Latina, Ásia e África. A sua biotransformação é extensiva e o produto de maior atividade farmacológica é o sulfóxido de albendazol (SOX); no entanto, o seu produto final (sulfona) (SON) não é dotado de atividade farmacológica.

O albendazol é encontrado em baixas concentrações plasmáticas após a administração oral, uma vez que possui baixa disponibilidade sistêmica como consequência da pobre absorção gastrointestinal e da extensiva biotransformação. Dessa forma, muitos trabalhos que não apresentam detectabilidade suficiente para o albendazol inalterado utilizam a concentração do sulfóxido para traçar as curvas farmacocinéticas.¹⁵²⁻¹⁵⁶ A Figura 1.19 ilustra as estruturas químicas dos benzimidazóis estudados.

Figura 1.19 Estrutura química do albendazol (A), dos seus principais produtos de biotransformação (sulfóxido de albendazol (B) e albendazol sulfona (C)), e do mebendazol (MEB) (D) (usado como padrão interno).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.KOH, H.-L.; YAU, W.-P.; ONG, P.-S.; HEGDE, A. Current trends in modern pharmaceutical analysis for drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 8, n. 19, p. 889-897, 2003.
- 2.KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.
- 3.FU, X. F.; LIAO, Y. P.; LIU, H. W. Sample preparation for pharmaceutical analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 381, n. 1, p. 75-77, 2005.
- 4.BRASIL. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Estabelece o medicamento genérico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 fev. 1999. Seção 1, p. 1.
- 5.MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, p. 16-20, 1991.
- 6.MOLDOVEANU, S. C. Solutions and challenges in sample preparation for chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 1-14, 2004.
- 7.SMITH, R. M. Before the injection: modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, 2003.
- 8.THEODORIDIS, G.; PAPADOYANNIS, I. N. Modern sample preparation methods in chemical analysis. **Mikrochim. Acta**, v. 136, n. 3-4, p. 199-204, 2001.
- 9.MÖLLER, K. **Molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography for biological samples**. 2006. 91 f. Thesis (Doctoral) – Department of Analytical Chemistry, Stockholm University, Stockholm, 2006.
- 10.PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 247 p.
- 11.LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A**, v. 902, n. 1, p. 17-63, 2000.

12. RODRIGUES, J. C.; SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; ALVES, C.; CONTADORI, A. S.; LANCAS, F. M. Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1105, n. 1-2, p. 208-212, 2006.
13. ALVES, C.; FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; QUEIROZ, M. E. C.; LANCAS, F. M. Optimization of the SPME parameters and its online coupling with HPLC for the analysis of tricyclic antidepressants in plasma samples. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 340-346, 2006.
14. FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANCAS, F. M. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. **J. Chromatogr. B**, v. 847, n. 2, p. 217-223, 2007.
15. QUEIROZ, M. E. C.; LANCAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.
16. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 902, n. 1, p. 167-194, 2000.
17. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **J. Microcol. Sep.**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.
18. RADCLIFFE, C.; MAGUIRE, K.; LOCKWOOD, B. Applications of supercritical fluid extraction and chromatography in forensic science. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 43, n. 1-3, p. 261-272, 2000.
19. TURNER, C.; ESKILSSON, C. S.; BJORKLUND, E. Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction. **J. Chromatogr. A**, v. 947, n. 1, p. 1-22, 2002.
20. JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **J. Chromatogr. A**, v. 902, n. 1, p. 205-225, 2000.
21. JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction in analytical chemistry. **J. Sep. Sci.**, v. 24, n. 7, p. 495-507, 2001.

22. PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.
23. ZHAO, L.; LEE, H. K. Liquid-phase microextraction combined with hollow fiber as a sample preparation technique prior to gas chromatography/mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 11, p. 2486-2492, 2002.
24. BUSZEWSKI, B.; LIGOR, T. Single-drop extraction versus solid-phase microextraction for the analysis of VOCs in water. **LC-GC**, v. 15, n. 2, p. 92-96, 2002.
25. POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.
26. GUIHEN, E.; GLENNON, J. D. Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1044, n. 1-2, p. 67-81, 2004.
27. CHAPUIS, F.; PICHON, V.; HENNION, M. C. Molecularly imprinted polymers: developments and applications of new selective solid-phase extraction materials. **LC-GC**, v. 17, n. 7, p. 408-417, 2004.
28. HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chem. Rev.**, v. 100, n. 7, p. 2495-2504, 2000.
29. MAJORS, R. E.; BOOS, K. S.; GRIMM, C. H.; LUBDA, D.; WIELAND, G. Practical guidelines for HPLC: integrated sample preparation using column switching. **LC-GC**, v. 14, n. 7, p. 554-560, 1996.
30. SADILEK, P.; SATINSKY, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends Anal. Chem.**, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007.
31. MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, n. 2, p. 263-273, 2007.
32. DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 544, p. 25-39, 1991.

- 33.HAGESTAM, I. H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 57, n. 8, p. 1757-1763, 1985.
- 34.YOSHIDA, H.; MORITA, I.; MASUJIMA, T.; IMAI, H. A direct injection method of plasma samples onto a reverse phase column for the determination of drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 6, p. 2287-2290, 1982.
- 35.YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. **Chromatographia**, v. 19, p. 466-472, 1984.
- 36.PINKERTON, T. C. High-performance liquid-chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. **J. Chromatogr.**, v. 544, n. 1-2, p. 13-23, 1991.
- 37.ANDERSON, D. J. High-performance liquid-chromatography: direct injection techniques. **Anal. Chem.**, v. 65, n. 12, p. R434-R443, 1993.
- 38.BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in HPLC: part I – classification and review. **LC-GC**, v. 15, n. 7, p. 602-611, 1997.
- 39.SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004.
- 40.CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.
- 41.BOOS, K.-S.; GRIMM, C.-H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 175-180, 1999.
- 42.BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D.; EISENBEISS, F. Alkyl-diol silica (ADS) - restricted access precolumn packings for direct-injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 352, n. 7-8, p. 684-690, 1995.

43. CHIAP, P.; RBEIDA, O.; CHRISTIAENS, B.; HUBERT, P.; LUBDA, D.; BOOS, K. S.; CROMMEN, J. Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 975, n. 1, p. 145-155, 2002.
44. RACAITYTE, K.; LUTZ, E. S. M.; UNGER, K. K.; LUBDA, D.; BOOS, K. S. Analysis of neuropeptide Y and its metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and integrated sample clean-up with a novel restricted-access sulphonic acid cation exchanger. **J. Chromatogr. A**, v. 890, n. 1, p. 135-144, 2000.
45. MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
46. CORRADINI, C. Coupled-column liquid chromatography. In: MONDELLO, L.; BARTLE, K. D.; LEWIS, A. C. (Ed.). **Multidimensional chromatography**. Chichester: John Wiley, 2002. p. 109-134.
47. MAJORS, R. E.; CARR, P. W. Glossary of liquid-phase separation terms. **LC-GC**, v. 19, n. 2, p. 124-162, 2001.
48. SCHOENMAKERS, P.; MARRIOTT, P.; BEENS, J. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. **LC-GC**, v. 16, n. 6, p. 335-339, 2003.
49. GUTTMAN, A.; VAROGLU, M.; KHANDURINA, J. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 3, p. 136-144, 2004.
50. HOGENDOORN, E.; VAN ZOONEN, P.; HERNANDEZ, F. The versatility of coupled-column LC. **LC-GC**, v. 16, n. 12A, p. 44-51, 2003.
51. VAN HOUT, M. W. J. **On-line coupling of sample pretreatment with chromatography or mass spectrometry for high-throughput analysis of biological samples**. 2003. 215 f. Thesis (Doctoral) – Institute for Drug Exploration, Groningen University, Groningen, 2003.
52. SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. D. Multidimensional chromatography: biomedical and pharmaceutical applications. In: MONDELLO, L.; BARTLE, K. D.; LEWIS, A. C. (Ed.). **Multidimensional chromatography**. Chichester: John Wiley, 2002. p. 251-302.

53. JOHANNESSON, N.; PEARCE, E.; DULAY, M.; ZARE, R. N.; BERGQUIST, J.; MARKIDES, K. E. On-line biological sample cleanup for electrospray mass spectrometry using sol-gel columns. **J. Chromatogr. B**, v. 842, n. 1, p. 70-74, 2006.
54. JOHANNESSON, N.; BERGQUIST, J. Rapid on-line extraction and quantification of escitalopram from urine using sol-gel columns and mass spectrometric detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, n. 3, p. 1045-1048, 2007.
55. CHASSAING, C.; LUCKWELL, J.; MACRAE, P.; SAUNDERS, K.; WRIGHT, P.; VENN, R. Direct analysis of crude plasma samples by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 53, n. 3-4, p. 122-130, 2001.
56. KOUSOULOS, C.; DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y. L. Turbulent flow and ternary column-switching on-line clean-up system for high-throughput quantification of risperidone and its main metabolite in plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 360-367, 2007.
57. VINTILOIU, A.; MULLETT, W. M.; PAPP, R.; LUBDA, D.; KWONG, E. Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1082, n. 2, p. 150-157, 2005.
58. HLUSHKOU, D.; TALLAREK, U. Transition from creeping via viscous-inertial to turbulent flow in fixed beds. **J. Chromatogr. A**, v. 1126, n. 1-2, p. 70-85, 2006.
59. HORVATH, C. G.; LIPSKY, S. R. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. **Anal. Chem.**, v. 41, n. 10, p. 1227-1234, 1969.
60. HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Anal. Chem.**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967.
61. GOLAY, M. **Gas chromatography**. New York: Academic Press, 1958. 36 p.
62. GIDDINGS, J. C. Comparison of the theoretical limit of separating ability in gas and liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 1890-1892, 1964.
63. GIDDINGS, J. C. **Dynamics of chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1965. v. 1.

- 64.ISHII, D.; ASAI, K.; HIBI, K.; JONOKUCHI, T.; NAGAYA, M. A study of micro-high-performance liquid chromatography : I. development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 144, n. 2, p. 157-168, 1977.
- 65.SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 169, p. 51-72, 1979.
- 66.KUCERA, P. Design and use of short microbore columns in liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 198, n. 2, p. 93-109, 1980.
- 67.HIRATA, Y.; NOVOTNY, M. Techniques of capillary liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 186, p. 521-528, 1979.
- 68.TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 50, n. 2, p. 271-275, 1978.
- 69.TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Band-broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 50, n. 4, p. 632-634, 1978.
- 70.YANG, F. J. Fused-silica narrow-bore microparticle-packed-column high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 236, n. 2, p. 265-277, 1982.
- 71.KARLSSON, K. E.; NOVOTNY, M. Separation efficiency of slurry-packed liquid-chromatography microcolumns with very small inner diameters. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 17, p. 1662-1665, 1988.
- 72.MCGUFFIN, V. L.; NOVOTNY, M. Optimization and evaluation of packed capillary columns for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 255, p. 381-393, 1983.
- 73.KENNEDY, R. T.; JORGENSEN, J. W. Preparation and evaluation of packed capillary liquid-chromatography columns with inner diameters from 20 to 50 μm . **Anal. Chem.**, v. 61, n. 10, p. 1128-1135, 1989.
- 74.HASKINS, W. E.; WANG, Z.; WATSON, C. J.; ROSTAND, R. R.; WITOWSKI, S. R.; POWELL, D. H.; KENNEDY, R. T. Capillary LC-MS² at the attomole level for monitoring and discovering endogenous peptides in microdialysis samples collected in vivo. **Anal. Chem.**, v. 73, n. 21, p. 5005-5014, 2001.

- 75.GALE, D. C.; SMITH, R. D. Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 7, n. 11, p. 1017-1021, 1993.
- 76.SHEN, Y.; TOLIC, N.; MASSELON, C.; PASA-TOLIC, L.; CAMP, D. G.; HIXSON, K. K.; ZHAO, R.; ANDERSON, G. A.; SMITH, R. D. Ultrasensitive proteomics using high-efficiency on-line micro-SPE-nanoLC-nanoESI MS and MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 76, n. 1, p. 144-154, 2004.
- 77.IVANOV, A. R.; ZANG, L.; KARGER, B. L. Low-attomole electrospray ionization MS and MS/MS analysis of protein tryptic digests using 20 μm -i.d. polystyrene-divinylbenzene monolithic capillary columns. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 20, p. 5306-5316, 2003.
- 78.LUO, Q.; PAGE, J. S.; TANG, K.; SMITH, R. D. MicroSPE-nanoLC-ESI-MS/MS using 10 μm -i.d. silica-based monolithic columns for proteomics. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 2, p. 540-545, 2007.
- 79.VISSERS, J. P. C. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 856, n. 1-2, p. 117-143, 1999.
- 80.CHERVET, J.-P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. B. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 9, p. 1507-1512, 1996.
- 81.HOLLAND, L. A.; MCKEON, J. Miniaturized liquid separation techniques in bioanalysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, n. 1, p. 40-42, 2004.
- 82.SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. State of the art in miniaturized separation techniques. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 2002.
- 83.ISHII, D.; TAKEUCHI, T. Miniaturization in column liquid chromatography. **Trends Anal. Chem.**, v. 9, n. 5, p. 152-157, 1990.
- 84.VISSERS, J. P. C.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A. Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. **J. Chromatogr. A**, v. 779, n. 1-2, p. 1-28, 1997.
- 85.ROZING, G. Trends in HPLC column formats: microbore, nanobore and smaller. **LC-GC**, v. 16, n. 6A, p. 14-19, 2003.

86. VISSERS, J. P. C.; DE RU, A. H.; URSEM, M.; CHERVET, J.-P. Optimised injection techniques for micro and capillary liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 746, n. 1, p. 1-7, 1996.
87. MEYER, V. R. High-performance liquid chromatographic theory for the practitioner. **J. Chromatogr.**, v. 334, p. 197-209, 1985.
88. KUCERA, P. **Microcolumn high-performance liquid chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 1984. (Journal of Chromatography Library, 28).
89. KENNEDY, G. J.; KNOX, J. H. The performance of packings in high performance liquid chromatography (HPLC): I. porous and surface layered supports. **J. Chromatogr. Sci**, v. 10, p. 549, 1972.
90. GUIOCHON, G.; FARKAS, T.; GUANSAJONZ, H.; KOH, J. H.; SARKER, M.; STANLEY, B. J.; YUN, T. Consolidation of particle beds and packing of chromatographic columns. **J. Chromatogr. A**, v. 762, n. 1-2, p. 83-88, 1997.
91. MAJORS, R. E. Advances in HPLC column packing design. **LC-GC**, v. 16, p. 8-13, 2003.
92. GUIOCHON, G.; SARKER, M. Consolidation of the packing material in chromatographic columns under dynamic axial-compression: I. fundamental study. **J. Chromatogr. A**, v. 704, n. 2, p. 247-268, 1995.
93. POOLE, C. F. Progress in packed column supercritical fluid chromatography: materials and methods. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 43, n. 1-3, p. 3-23, 2000.
94. NIESSEN, W. M. A.; TINKE, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry: general principles and instrumentation. **J. Chromatogr. A**, v. 703, n. 1-2, p. 37-57, 1995.
95. NIESSEN, W. M. A. Advances in instrumentation in liquid chromatography mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 794, n. 1-2, p. 407-435, 1998.
96. NIESSEN, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 856, n. 1-2, p. 179-197, 1999.
97. TOMER, K. B. Separations combined with mass spectrometry. **Chem. Rev.**, v. 101, n. 2, p. 297-328, 2001.

- 98.NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1-2, p. 413-436, 2003.
- 99.THOMSON, B. A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography mass spectrometry: together at last. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 9, n. 3, p. 187-193, 1998.
- 100.WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Anal. Chem.**, v. 57, n. 3, p. 675-679, 1985.
- 101.WONG, S. F.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). **J. Phys. Chem.**, v. 92, n. 2, p. 546-550, 1988.
- 102.BRUINS, A. P.; COVEY, T. R.; HENION, J. D. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 59, n. 22, p. 2642-2646, 1987.
- 103.DOLE, M.; MACK, L. L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B. Molecular beams of macroions. **J. Chem. Phys.**, v. 49, n. 5, p. 2240-2249, 1968.
- 104.IRIBARNE, J. V.; THOMSON, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **J. Chem. Phys.**, v. 64, n. 6, p. 2287-2294, 1976.
- 105.THOMSON, B. A.; IRIARNE, J. V. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. **J. Chem. Phys.**, v. 71, n. 11, p. 4451-4463, 1979.
- 106.DE LA MORA, J. F. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. **Anal. Chim. Acta**, v. 406, n. 1, p. 93-104, 2000.
- 107.KEBARLE, P.; PESCHKE, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. **Anal. Chim. Acta**, v. 406, n. 1, p. 11-35, 2000.
- 108.DAHLIN, A. **Microscale tools for sample preparation, separation and detection of neuropeptides**. 2005. 62 f. Thesis (Doctoral)– Department of Chemistry, Uppsala University, Uppsala, 2005.

- 109.ENKE, C. G. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. **Anal. Chem.**, v. 69, n. 23, p. 4885-4893, 1997.
- 110.HALASZ, I. Concentration and mass flow rate sensitive detectors in gas chromatography. **Anal. Chem.**, v. 36, n. 8, p. 1428-1430, 1964.
- 111.OOSTERKAMP, A. J.; GELPI, E.; ABIAN, J. Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 33, n. 10, p. 976-983, 1998.
- 112.HOPFGARTNER, G.; BEAN, K.; HENION, J.; HENRY, R. Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration- or a mass-flow-sensitive device? **J. Chromatogr. A**, v. 647, n. 1, p. 51-61, 1993.
- 113.HOPFGARTNER, G.; WACHS, T.; BEAN, K.; HENION, J. High-flow ion spray liquid-chromatography mass-spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 65, n. 4, p. 439-446, 1993.
- 114.IKONOMOU, M. G.; BLADES, A. T.; KEBARLE, P. Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance. **Anal. Chem.**, v. 63, n. 18, p. 1989-1998, 1991.
- 115.BRUINS, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. **J. Chromatogr. A**, v. 794, n. 1-2, p. 345-357, 1998.
- 116.ABIAN, J.; OOSTERKAMP, A. J.; GELPI, E. Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations. **J. Mass Spectrom.**, v. 34, n. 4, p. 244-254, 1999.
- 117.BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 13, n. 12, p. 1175-1185, 1999.
- 118.KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.
- 119.SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **J. Chromatogr. A**, v. 1058, n. 1-2, p. 61-66, 2004.

120. BASIC theory of mass spectrometry. **Clin. Chim. Acta**, v. 241-242, p. 15-71, 1995.
121. MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. **Anal. Chem.**, v. 72, n. 6, p. 1156-1162, 2000.
122. VEKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.
123. COOKS, R. G.; HOKE, S. H.; MORAND, K. L.; LAMMERT, S. A. Mass spectrometers: instrumentation. **Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes**, v. 118, p. 1-36, 1992.
124. CHOI, B. K.; HERCULES, D. M.; ZHANG, T. L.; GUSEV, A. I. Comparison of quadrupole, time-of-flight and Fourier transform mass analyzers for LC-MS applications. **Spectroscopy**, v. 18, n. 5, p. S24-S31, 2003.
125. LEMIÉRE, F. Mass analysers for LC-MS. **LC-GC**, p. 22-28, 2001.
126. HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass spectrometry basics**. Boca Raton: CRC, 2003. 474 p.
127. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. Rockville: Drug Information Branch, 2001. 22 p.
128. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology - Q2(R1)**. 2005. 13 p. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2007.
129. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.
130. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
131. CHASIN, A.; NASCIMENTO, E. S.; NASCIMENTO, L. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M.; SALVADORI, M.; FERNÍCOLA, N. A. G. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

132.KARNES, H. T.; GERALD, S.; VINOD, P. S. Validation of bioanalytical methods. **Pharm. Res.**, v. 8, n. 4, p. 421-426, 1991.

133.CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

134.BRAGGIO, S.; BARNABY, R. J.; GROSSI, P.; CUGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, n. 4, p. 375-388, 1996.

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

136.VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J.; DANZER, K.; LINDER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

137.ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J. Chromatogr. B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

138.KISER, M. M.; DOLAN, J. W. Selecting the best curve fit. **LC-GC**, v. 22, n. 2, p. 112-117, 2004.

139.BURKE, S. Regression and calibration. **LC-GC**, 2001. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/502001/4500/article.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2007.

140.DANZER, K.; CURRIE, L. A.; CHEM, C. G. A. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry: part 1. fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998). **Pure Appl. Chem.**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

141.BARROS NETO, B. D.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

142.CUADROS-RODRIGUEZ, L.; GAMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LOPEZ, E.; LASO-SANCHEZ, J. Calibration in chemical measurement processes: I. a metrological approach. **Trends Anal. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 195-206, 2001.

143.CUADROS-RODRIGUEZ, L.; GAMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LOPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. a methodological approach. **Trends Anal. Chem.**, v. 20, n. 11, p. 620-636, 2001.

144.ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. **Is my calibration linear?** London: The Royal Society of Chemistry, 2000. 2 p. Disponível em: <http://www.rsc.org/images/brief3_tcm18-25924.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2007.

145.ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Is my calibration linear? **Analyst**, v. 119, p. 2363-2366, 1994.

146.PRESKORN, S. H.; DOREY, R. C.; JERKOVICH, G. S. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. **Clin. Chem.**, v. 34, n. 5, p. 822-828, 1988.

147.IVANDINI, T. A.; SARADA, B. V.; TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; TRYK, D. A.; ISHIGURO, H.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, v. 521, n. 1-2, p. 117-126, 2002.

148.RAGGI, M.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; VOLTERRA, V.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Improved HPLC determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. **Chromatographia**, v. 50, n. 7, p. 423-427, 1999.

149.VLASE, L.; IMRE, S.; LEUCUTA, S. Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 659-663, 2005.

150.YOSHIDA, H.; HIDAKA, K.; ISHIDA, J.; YOSHIKUNI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Highly selective and sensitive determination of tricyclic antidepressants in human plasma using high-performance liquid chromatography with post-column tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(III) chemiluminescence detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 413, n. 1-2, p. 137-145, 2000.

151.RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, n. 1-2, p. 193-199, 1998.

152.BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, O. M. Simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 783, n. 1, p. 237-245, 2003.

153.LANCHOTE, V. L.; MARQUES, M. P. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; DE CARVALHO, R.; PAIAS, F. O.; BONATO, P. S. Simultaneous determination of albendazole sulfoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 709, n. 2, p. 273-279, 1998.

154.HOAKSEY, P. E.; AWADZI, K.; WARD, S. A.; COVENTRY, P. A.; ORME, M. L. E.; EDWARDS, G. Rapid and sensitive method for the determination of albendazole and albendazole sulfoxide in biological fluids. **J. Chromatogr. B**, v. 566, n. 1, p. 244-249, 1991.

155.MIRFAZAELIAN, A.; DADASHZADEH, S.; ROUINI, M. R. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of albendazole metabolites in human serum. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, n. 4, p. 1249-1254, 2002.

156.VALOIS, M. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; CARVALHO, D. Determination of albendazole metabolites in plasma by HPLC. **J. Anal. Toxicol.**, v. 18, n. 2, p. 86-90, 1994.

CAPÍTULO 2

***Column switching* RAM-LC-UV em escala convencional e *microbore* para análise de fármacos em fluidos biológicos**

“An expert is a man who made all the mistakes which can be made in a very narrow field.”

Niels Bohr

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos métodos relatados na literatura para a análise de FLU ainda utiliza LLE, porém essa técnica é laboriosa, consome muito solvente e expõe o analista ao contato com amostras biológicas potencialmente contaminadas.¹⁻⁴ A SPE tem sido usada em algumas aplicações, apresentando sobre a LLE a vantagem de reduzir o consumo de solventes. Entretanto, apesar da possibilidade de automação da SPE, a maioria dos trabalhar tem usado sistemas manuais. Além do mais, a SPE tradicional requer a utilização de uma grande quantidade de cartuchos não reaproveitáveis.⁵⁻⁷ Essas técnicas têm sido utilizadas no preparo de amostras para análise de FLU por GC usando detectores de captura de elétrons (ECD), de nitrogênio-fósforo (NPD), ou MS, com ou sem derivatização.⁶⁻⁹ Por outro lado, LC apresenta maior compatibilidade com esse tipo de analito e é a técnica mais empregada em sua determinação. UV, fluorescência (FL), e MS são as formas de detecção mais empregadas, sendo as duas primeiras comumente encontradas em laboratórios analíticos.¹⁰⁻¹²

Column switching tem sido utilizada como uma alternativa às técnicas de preparo de amostras mais tradicionais.¹³⁻¹⁶ Aplicações de colunas RAM realizando a etapa de exclusão/extração para o preparo de amostras de fluidos biológicos em abordagens LC multidimensionais podem ser encontradas na literatura.¹⁷⁻²⁰ Há diversas colunas RAM disponíveis comercialmente, mas essas colunas também podem ser preparadas no próprio laboratório. Seguindo um protocolo descrito por Menezes e Felix,²¹ Cass et al. têm usado BSA para a modificação *in situ* de partículas com fase ligada em partículas RAM-BSA, de modo a analisar diferentes fármacos em fluidos biológicos.²²⁻²⁴

A miniaturização de técnicas analíticas é uma tendência atual, devido à série de vantagens que essa traz. Esse assunto já foi discutido no capítulo anterior e na segunda parte

desse capítulo o primeiro passo na miniaturização da LC com *column switching* para a escala *microbore* é apresentado.

2 OBJETIVO

O objetivo dessa parte do trabalho foi desenvolver um sistema automatizado de *column switching* LC para análise de FLU em amostras de plasma. Foram utilizadas colunas analíticas e excludentes/extratoras preparadas no próprio laboratório e um método para *column switching* usando uma coluna RAM-BSA-C18 foi desenvolvido. Compararam-se os modos *foreflush* e *backflush* de *column switching* e com o método desenvolvido reduziu-se o manuseio da amostra, o tempo de análise e o consumo de amostra e solventes.

Além disso, na segunda etapa foi avaliada a viabilidade de um sistema operando com colunas *microbore*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Padrões analíticos de FLU e CLO (padrão interno) utilizados no método em escala convencional foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha), bem como os padrões de paroxetina (PAR), DES, NOR, IMI, AMI utilizados na escala *microbore*. Os padrões dos anti-helmínticos (SOX, SON, ALB e MEB), também utilizados na escala *microbore*, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Demerval de Carvalho (UNAERP, Ribeirão Preto, Brasil). Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), grau HPLC, foram obtidos de Mallinckrodt (Paris, EUA). Água foi purificada utilizando uma estação Milli-Q da Millipore

(Bedford, MA, EUA). Membranas de filtração hidrofóbicas e hidrofílicas de 0,45 µm foram adquiridas de Millipore. Acetato de amônio, ácido acético, fosfato de potássio monobásico e hidróxido de potássio, todos PA, foram adquiridos de Mallinckrodt, enquanto trietilamina (TEA), também PA, e Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 foram obtidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Albumina sérica bovina (BSA) de Gibco-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD, EUA), borohidreto de sódio de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v), grau reagente, de J.T. Baker foram empregados no preparo das colunas RAM-BSA-C18.

A fase estacionária usada no preparo das colunas RAM foi Kromasil C18, partículas de 10 µm e poro de 120 Å, de Eka Chemicals AB (Bohus, Suécia), a qual foi modificada *in situ*, após o empacotamento. A fase estacionária Phase Sep C18, partículas de 3 µm, de Phase Separations (Norwalk, EUA) foi utilizada para preparar a coluna analítica empregada na escala convencional; coluna Zorbax XDB RP-18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm de partículas) foi utilizada na escala *microbore*. Tubos de aço inoxidável (4,6 mm de *i.d.*; 1/4" de *o.d.*), conexões do tipo *end-fittings* e *frits* de aço inoxidável (2 µm) foram compradas de Swagelok (Sólon, OH, EUA) para o preparo das colunas em escala convencional. *Hardware* para empacotamento de colunas *microbore*, utilizado no preparo da coluna RAM de 2,1 mm de *i.d.*, foi adquirido de Alltech (Deerfield, IL, EUA). Plasma livre de fármacos foi gentilmente cedido pelo banco de sangue da Santa Casa de São Carlos e tubos para coleta a vácuo de 5 mL com EDTA (Vacuum II, Labnew, Campinas, Brasil) foram usados para coletar outras amostras de sangue. Amostras de plasma provenientes de um total de seis doadores-controle saudáveis foram avaliadas quanto a presença de interferentes para a análise de fluoxetina.

3.2 SISTEMA DE *COLUMN SWITCHING*

O sistema de cromatografia líquida por *column switching* consistiu da adaptação de um cromatógrafo a líquido série 10Avp da Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema ilustrado na Figura 2.1 foi constituído de duas bombas LC-10Ai, um seletor de solventes FCV-10AL, um degaseificador DGU-14A, um amostrador automático SIL-10Avp e um controlador SCL-10Avp. As bombas, bem como o amostrador e o detector, foram adequadamente acoplados a uma válvula *microbore* Cheminert de seis vias e duas posições (Valco, Houston, TX, EUA). O *software* Class-VP (Shimadzu) controlou todos os eventos do sistema, bem como o microatuador eletrônico da válvula seletora (*switching valve*). Na Figura 2.2 detalha-se a válvula de seleção ligada às colunas cromatográficas alojadas no forno do cromatógrafo.

Figura 2.1 Fotografia do sistema de *column switching* desenvolvido.

Figura 2.2 Detalhe do forno, contendo as colunas, e da válvula seletora de colunas.

A Figura 2.3 ilustra os dois modos de operação do sistema de *column switching*, usando a válvula de seis vias e duas posições. No arranjo A o sistema opera no modo *backflush*, enquanto que no arranjo B o sistema opera no modo *foreflush* (ou seja, sem a inversão do sentido do fluxo na coluna RAM). Em *backflush* (arranjo A) a bomba A impulsiona água através do amostrador e coluna RAM quando a válvula é mantida na posição A. Ao mesmo tempo uma adequada fase móvel de eluição e separação é impulsionada pela bomba B, condicionando a coluna analítica e o detector. Enquanto a válvula é mantida na posição A (linha contínua) a injeção da amostra é realizada e as macromoléculas hidrofílicas do plasma são excluídas através da coluna RAM. Depois de um tempo adequado, a válvula seletora é girada para a posição B (linha tracejada) e a fase móvel impulsionada pela bomba B é direcionada pelo sentido inverso da coluna RAM. Nesse momento os analitos são eluídos da coluna RAM em direção à coluna analítica, através da qual são separados, atingindo o detector UV. No modo *foreflush* (arranjo B) uma válvula seletora de solventes é usada para

selecionar o solvente dispensado pela bomba A, as linhas A-C, representadas na Figura 2.1, referem-se a água, fase móvel de eluição e separação, e ACN:água (75:25), respectivamente. Durante a primeira etapa água é selecionada para a bomba A, enquanto a bomba B impulsiona fase móvel com a mesma composição daquela utilizada para eluição e separação dos analitos, de maneira a condicionar a coluna analítica e detector. Após a injeção e exclusão das macromoléculas, a válvula seletora de solventes passa a direcionar o conteúdo da linha B através da bomba A e a válvula seletora de colunas gira para a posição B (linha tracejada). Assim, a fase móvel de eluição e separação contida na linha B é impulsionada através da coluna RAM, no mesmo sentido que a fase móvel anterior (*foreflush*), eluindo os analitos e separando-os através da coluna analítica. Depois da eluição, a válvula seletora de colunas retorna para a posição inicial (A) e a mistura ACN:água (75:25) da linha C é usada para completar a limpeza da coluna RAM. Para finalizar, o sistema volta às condições iniciais, com água fluindo pela linha A, até que esteja recondicionado. Durante todas as etapas as bombas operam em modo isocrático.

Figura 2.3 Modos de operação do sistema de column switching: (A) *backflush* e (B) *foreflush*, usando válvula seletora de seis vias e duas posições. As linhas contínuas indicam a orientação da válvula na posição A e as linhas pontilhadas indicam a orientação da válvula na posição B.

3.3 PREPARO DAS COLUNAS

Tubos de aço inoxidável com 4,6 mm de *i.d.* foram cortados em segmentos de 40 e 50 mm de comprimento para as colunas RAM e analítica convencionais, respectivamente. Para a coluna RAM *microbore* o tubo de aço inoxidável com 2,1 mm de *i.d.* foi cortado no comprimento de 40 mm e nova rosca foi preparada, para adaptação da conexão *end-fitting*. As colunas foram empacotadas usando um sistema de empacotamento por *slurry*, pressurizado por uma bomba pneumática amplificadora de alta capacidade (Haskel, Burbank, EUA). O reservatório de empacotamento utilizado para a escala convencional foi adquirido de Alltech. O reservatório utilizado para a escala *microbore* foi projetado como parte desse trabalho e construído na oficina mecânica do Instituto de Química de São Carlos. MeOH foi usado como solvente de suspensão (*slurry*) e de empacotamento, tendo sido pressurizado sob 7500 psi. Suspensão das partículas de sílica com fase ligada C18 (0,8 g mL⁻¹) foi agitada em banho de ultra-som, por um minuto, sendo em seguida transferida para o reservatório de empacotamento. A Figura 2.4 ilustra o sistema usado para o empacotamento das colunas. Após a introdução da suspensão no reservatório de empacotamento previamente adaptado ao tubo da coluna cromatográfica, o dispositivo foi acoplado à bomba pneumática e a alimentação de gás foi aberta, iniciando o empacotamento. O sistema foi pressurizado por 30 minutos e após 3 horas de despressurização, a coluna empacotada foi removida e teve sua entrada fechada por um *frit* e o respectivo *end-fitting*. As colunas convencionais preparadas são apresentadas na Figura 2.5 e as colunas *microbore* apresentadas na Figura 2.6.

Figura 2.4 Sistema de empacotamento por *slurry packing*. (1) cilindro de gás nitrogênio, (2) bomba pneumática, (3) reservatório do solvente, (4) reservatório do *slurry*, (5) coluna cromatográfica e (6) descarte do solvente.

Figura 2.5 Fotografia das colunas convencionais desenvolvidas. Acima a coluna analítica e abaixo dessa a coluna RAM.

Figura 2.6 Fotografia das colunas RAM *microbore* desenvolvidas e da coluna analítica como referência (topo).

Depois de empacotadas, as colunas foram condicionadas com fase móvel composta de mistura ACN:água (70:30) por oito horas. No preparo da coluna RAM, a pré-coluna foi, subseqüentemente, condicionada com tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 6,0) e modificada *in situ*, de maneira similar àquela descrita na referência 21. Como alguns reagentes podem contaminar o sistema cromatográfico (solução protéica e glutaraldeído) ou dificultar o bombeamento (solução de borohidreto de sódio) devido à formação de bolhas, os reagentes usados na modificação *in situ* foram pressurizados diretamente por N₂, como ilustrado na Figura 2.7. Um reservatório foi utilizado para acondicionar o solvente a ser percolado pela coluna e, pelo controle da pressão, a vazão dos reagentes foi ajustada para aproximadamente 1 mL min⁻¹ para a escala convencional e 200 µL min⁻¹ para a escala *microbore*. Resumindo, o tampão fosfato foi percolado por 20 minutos, seguindo-se a passagem de solução de BSA 1,0 mg mL⁻¹ (preparada no mesmo tampão), por 20 minutos. A seguir, percolou-se solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v) por 5 minutos, deixando-se o sistema em repouso por 5 horas. Então, foi passado pela pré-coluna um volume aproximado de 5 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio 1 mg mL⁻¹ e, após 2 horas de repouso, a coluna foi condicionada com água Milli-Q por 8 horas em sistema cromatográfico convencional. Para a coluna *microbore* o procedimento foi similar, porém os volumes de solvente utilizados em cada etapa foram reduzidos 5 vezes.

Figura 2.7 Sistema de pressurização dos reagentes para a modificação *in situ* da coluna. (1) cilindro de gás nitrogênio, (2) válvula agulha, (3) válvula de 3 vias, (4) reservatório para os reagentes, (5) coluna e (6) descarte.

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A ESCALA CONVENCIONAL

Para ambos os modos, *foreflush* e *backflush*, 100 μL de plasma foram injetados. Para avaliar a capacidade excludente da coluna RAM, o eluato proveniente das injeções de plasma foi coletado e o conteúdo de proteínas foi quantificado usando o método de Bradford.²⁵ Injeções de plasma foram realizadas no sistema cromatográfico e o eluato da coluna RAM foi coletado após diferentes tempos de exclusão. Para, proporcionalmente, avaliar a extensão da exclusão protéica, compararam-se as injeções de amostras de plasma na coluna RAM e as injeções em um sistema montado sem a coluna RAM. A válvula seletora de colunas foi inicialmente mantida na posição A e no intervalo entre 4 e 6,5 minutos ela foi atuada para a posição B. A fase móvel de eluição e separação foi constituída de acetato de amônio (5 mM) + TEA (5mM) tamponados em pH 5,4 com ácido acético:ACN (40:60). Ambas as colunas foram mantidas dentro do forno a 35 °C e o detector UV foi ajustado para 226 nm.

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A ESCALA MICROBORE

Na escala *microbore* um volume de 20 μL de plasma humano centrifugado foi injetado nos testes com antidepressivos; 100 μL de plasma bovino (centrifugado, diluído 1:1 e filtrado por membrana filtrante hidrofílica de acetato de celulose (0,22 μm)) foram injetados nos testes com os anti-helmínticos. Os antidepressivos foram separados usando acetato de amônio (5 mM) + TEA (5mM) tamponados em pH 5,4 com ácido acético:ACN (50:50) e os anti-helmínticos usando a mesma mistura na proporção (70:30), ambos com a vazão ajustada para 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. A válvula seletora foi colocada na posição B entre 2 e 4,5 minutos, o detector

ajustado em 226 nm para os antidepressivos e 290 nm para os anti-helmínticos, e o forno mantido a 35 °C.

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS PADRÕES ANALÍTICOS PARA A VALIDAÇÃO

Soluções estoque de FLU e CLO (padrão interno) foram preparadas em MeOH. Soluções intermediárias a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas pela diluição das soluções estoque. Soluções de trabalho de FLU a 1,5 e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e CLO a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas a partir das soluções intermediárias. Essas soluções foram usadas para fortificar todas as amostras de plasma utilizadas e foram mantidas sob refrigeração a 4 °C.

De modo a atingir as concentrações de 15, 30, 80, 130, 250 e 500 ng mL^{-1} , alíquotas adequadas de soluções de trabalho foram transferidas para frascos eppendorf, secadas em uma secadora centrífuga a vácuo e ressuspendidas em 0,3 mL de plasma humano branco. As amostras foram agitadas por 30 s, centrifugadas a 7100g e transferidas para frascos apropriados que foram levados ao amostrador automático.

3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE FLUOXETINA

Uma curva analítica usando as seis concentrações indicadas na seção anterior foi construída com quintuplicatas em 15, 80, e 500 ng mL^{-1} e triplicatas nos outros pontos, totalizando $n = 24$. A precisão intra-dia foi avaliada em quintuplicata nas três concentrações mencionadas acima, em três dias consecutivos, e a precisão inter-dias foi avaliada entre eles com $n = 15$. A exatidão e recuperação absoluta também foram avaliadas nos mesmos pontos, bem como a recuperação para o padrão interno. Com essas corridas, o intervalo de linearidade,

a correlação e o LQ foram calculados. Em todos os calibradores a CLO foi fortificada na concentração de 100 ng mL⁻¹ como padrão interno. A equação da regressão linear e o coeficiente de correlação (r) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados. As precisões foram reportadas como RSD e o LQ foi estabelecido como a concentração onde o pico do analito foi pelo menos dez vezes maior que o ruído da linha de base, com um RSD menor do que 20%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SISTEMA EM ESCALA CONVENCIONAL

A primeira etapa no desenvolvimento desse método foi a caracterização da capacidade de exclusão da coluna RAM, preparada e modificada no laboratório. O eluato coletado nos quatro minutos após a injeção de 100 µL de plasma não tratado evidenciou a exclusão de mais do que 99% das proteínas. Esse resultado foi obtido comparando-se a medida das proteínas presentes no eluato com as proteínas totais do plasma, pelo método de Bradford (ver Figura 2.8). O perfil de exclusão das macromoléculas hidrofílicas do plasma pode ser visto na Figura 2.9. Esse cromatograma foi obtido em 280 nm por ser o comprimento de onda de melhor absorção da albumina, a proteína mais abundante do plasma humano. As bandas protéicas são eluídas no início da corrida e, após quatro minutos, a linha de base já retornou ao seu nível anterior, em concordância com os resultados do método de Bradford. Resultado similar pode ser observado em trabalho de Cass et al.,²⁶ usando uma coluna RAM preparada por protocolo semelhante.

Figura 2.8 Avaliação da capacidade de exclusão das proteínas pela coluna RAM e comparação com a injeção e coleta do eluato por análise em fluxo (FIA). Porcentagem de exclusão obtida pelo cálculo das proteínas totais usando o método de Bradford.

Figura 2.9 Perfil de exclusão cromatográfica das proteínas do plasma após injeção de 100 μ L de amostra. Comprimento de onda = 280 nm.

Dois modos de *column switching* podem ser empregados usando uma válvula seletora de 6 vias conectando as colunas RAM e analítica: *foreflush* e *backflush*. No primeiro modo, a coluna RAM tem o fluxo mantido sempre no mesmo sentido, enquanto, no segundo, o fluxo é

invertido no momento que a coluna RAM é conectada com a analítica. A maioria dos trabalhos descritos na literatura usa o modo *backflush*, contudo, nesse trabalho, ambas as possibilidades foram exploradas. A Figura 2.10 mostra um cromatograma típico obtido em modo *foreflush*, em contraste com o cromatograma de uma injeção subsequente em branco. A Figura 2.11 mostra um cromatograma em modo *backflush*, em contraste com o cromatograma de uma injeção subsequente em branco. Ambos os modos resultaram em perfis de separação adequados. Uma melhor comparação entre os dois modos é apresentada na Figura 2.12, na qual os seus cromatogramas estão sobrepostos. Para a FLU, o modo *foreflush* resultou em pico ligeiramente mais estreito, sendo o pico da CLO 10% mais estreito nesse mesmo modo. Em alguns casos, quando o sistema desenvolvido é sensível ao excesso de volume morto, a utilização de *foreflush* pode ser desaconselhada, como será relatado no próximo capítulo e é apresentado nas referências 27 e 28. Contudo, quando o volume morto da coluna RAM não é demasiado para o sistema, tal modo auxilia na conservação da coluna analítica, pois a pré-coluna atua também como filtro de linha nessa opção. Quando um sistema é projetado para operar no modo *backflush*, qualquer material particulado presente no plasma, e retido no topo da coluna RAM, pode ser revertido para a coluna analítica, se essa não for adequadamente protegida. O tempo de retenção em *foreflush* foi menos de 2 minutos mais longo como consequência dos analitos terem que primeiramente atravessar a coluna RAM e depois a coluna analítica. Contudo esse atraso na análise é aceitável, visto que nesse modo a coluna RAM atua também prevenindo obstruções e eventual perda precoce da coluna analítica. Em ambos os modos desenvolvido para essa aplicação, nenhum preparo de amostras, adicionalmente a centrifugação do plasma, foi necessário.

Figura 2.10 Cromatograma em modo *foreflush* comparado com cromatograma de uma injeção em branco.

Figura 2.11 Cromatograma em modo *backflush* comparado com cromatograma de uma injeção em branco.

Figura 2.12 Comparação entre os cromatogramas obtidos nos modos *foreflush* e *backflush*.

Os resultados provenientes da validação do método desenvolvido são apresentados nas Tabelas 2.1 e 2.2. Valores adequados para os ensaios de precisão intra-dia e inter-dias foram obtidos para todo o intervalo de linearidade estudado. Alguns trabalhos têm relatado a recuperação em *column switching* com base nas injeções de soluções-padrão dos analitos preparadas em água, comparando-as com amostras fortificadas na mesma concentração e extraídas pelo mesmo sistema. Esse tipo de recuperação pode ser definido como recuperação relativa ou aparente, e não reflete se um sistema extrai eficientemente um determinado analito, apenas se a matriz influencia na extração conseguida para a solução aquosa (efeito de matriz).^{29,30} O que acontece no caso de extrações por *column switching*, seguindo a abordagem descrita acima, é que a coluna RAM atua efetuando a extração do analito presente na matriz, qualquer que seja ela, biológica ou aquosa. Efetuando-se o cálculo dessa maneira, observaram-se valores de aproximadamente 100% para todos os pontos avaliados (baixo, médio, alto e padrão interno). Como essa abordagem não reflete a recuperação real ou absoluta, tentou-se outra forma para essa avaliação. Para avaliação da recuperação absoluta, amostras de plasma foram extraídas com o arranjo instrumental em *column switching*. Esses

resultados foram comparados com injeções de massa equivalente a 100% da quantidade de analito fortificada no plasma, contidas em 20 μL de solução aquosa, carregadas diretamente na coluna analítica. Nesse caso o sistema cromatográfico foi arranjado ordinariamente em modo unidimensional. Essa não é a situação ideal, pois as separações em arranjo multidimensional e unidimensional não mantêm o mesmo perfil cromatográfico. Contudo, traduzem para um resultado mais plausível para a recuperação absoluta. De fato, as recuperações absolutas medidas como descrito acima também foram próximas de 100% para todos os pontos estudados, com exceção do LQ. Essa menor recuperação foi reconhecida mais como um artefato causado pelas diferenças entre os perfis cromatográficos do que como uma ineficiência da capacidade extratora. No modo multidimensional o pico fica mais largo, portanto mais baixo. Assim, qualquer variação da linha de base é mais marcante, resultando em menor área integrada. No modo unidimensional, a linha de base é mais estável e o pico, que é mais estreito e alto, destaca-se melhor da linha de base, resultando em maior área integrada. Outro fato que corrobora a adequação do LQ é seu perfeito ajuste dentro da região linear da curva analítica construída (Figura 2.13), mais um argumento favorável à hipótese artefactual. Para finalizar essa discussão, vale destacar que, além do mais, recuperações acima de 60% já são aceitáveis para o nível de concentração estudado (segundo a Tabela 1.5, apresentada no **Capítulo 1**) e exatidões adequadas para todos os níveis reforçam os méritos da validação.

Tabela 2.1 Precisões obtidas para o método desenvolvido.

Concentração (ng mL^{-1})	Precisão (% RSD)			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Entre-dias
15	3,2	7,8	5,7	14,0
82	3,1	11,9	5,0	9,3
500	2,9	9,6	9,6	9,3

Tabela 2.2 Exatidões e recuperações obtidas para o método desenvolvido.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Exatidão (<i>bias</i>)
15	64,4	-3,0
80	100,0	-8,9
500	105,0	-0,8
PI	90,9	NA*

*NA = Não se aplica.

Figura 2.13 Curva analítica obtida para a FLU, contendo os intervalos de confiança e previsão estatisticamente calculados.

Um LQ de 15 ng mL⁻¹ foi obtido, e todo o intervalo estudado, entre 15 e 500 ng mL⁻¹, mostrou-se linear sob a investigação de um gráfico de resíduos (Figura 2.14) e comparação estatística por teste F (nível de significância de 0,05) entre um ajuste linear e um quadrático (Figura 2.15). O coeficiente de correlação foi de 0,999 com o intercepto em -0,0076 e inclinação de 0,0045, usando a CLO como padrão interno. Seis diferentes amostras brancas de plasma foram avaliadas quanto à presença de interferentes e nenhum composto estranho eluiu nos tempos de retenção da FLU e do padrão interno. Para evitar a retenção de compostos pouco polares na coluna RAM, o que poderia ocasionar a eluição de interferentes mais retidos

em outras corridas de uma sequência, uma etapa de lavagem da coluna RAM com ACN:água (75:25) foi estabelecida. Esse procedimento resultou em linha de base bastante limpa nos tempos de retenção dos compostos de interesse, além de evitar efeitos de memória entre as injeções. Isso pode ser observado na Figura 2.16, onde um cromatograma na concentração do LQ é comparado com um cromatograma de plasma branco, cuja amostra foi injetada imediatamente após uma corrida do ponto mais alto da curva de analítica.

Figura 2.14 Gráfico de resíduos para o ajuste dos dados experimentais da FLU à reta de regressão linear.

Figura 2.15 Comparação entre o ajuste de uma reta e uma parábola aos dados experimentais para a curva analítica da FLU.

Figura 2.16 Comparação entre um cromatograma do LQ e um cromatograma de injeção de amostra branca subsequente à injeção do ponto mais alto da curva analítica.

O tempo total de análise foi de 20 minutos por amostra, incluindo as etapas de preparo de amostras e condicionamento para a injeção posterior. No mais, esse procedimento não empregou nem extensivo manuseio da amostra, nem preparo de amostras *off-line*. Assim, essa abordagem pode superar as limitações das tradicionais SPE e LLE, concernindo o consumo de solventes e tempo de análise, bem como a exposição do analista ao risco de contaminação. Adicionalmente, o acoplamento desse procedimento com a espectrometria de massas poderia resultar em aplicabilidade ainda mais ampla e com melhoria na detectabilidade.

4.2 SISTEMA EM ESCALA *MICROBORE*

O sistema em escala *microbore* foi avaliado em comparação ao sistema convencional, e em muitos aspectos há grande semelhança. Contudo, de maneira geral, os métodos desenvolvidos nessa escala apresentam maior compatibilidade com a espectrometria de massas. Apesar dos resultados apresentados nessa parte do trabalho não terem sido validados

e avaliados no acoplamento com a espectrometria de massas, eles apresentam comportamento bastante promissor para futuras aplicações.

A Figura 2.17 ilustra com cromatograma típico a exclusão das proteínas, após a injeção de 20 μL de plasma branco. Com a coluna RAM *microbore*, programou-se o aumento da vazão da água para 1 mL min^{-1} durante a exclusão das macromoléculas, assim conseguiu-se uma exclusão adequada depois de aproximadamente 2 minutos decorridos da injeção.

No caso de futuras aplicações para a análise por LC-MS, uma perfeita separação sem co-eluição de nenhum composto não é absolutamente necessária. Uma vez que não haja supressão da ionização causada pela eluição de diversos compostos altamente concentrados no mesmo tempo de retenção, um pequeno grau de co-eluição não é preocupante. Assim, para avaliar uma futura aplicação dessa técnica na análise simultânea de diversos antidepressivos, a injeção de sete compostos foi avaliada. Como a detecção usada nessa etapa foi UV, os compostos são apresentados em duas figuras diferentes para evitar sobreposição de picos.

Figura 2.17 Exclusão das macromoléculas do plasma após a injeção de 20 μL de amostra sob uma vazão de 1 mL min^{-1} . Comprimento de onda = 280 nm.

Na Figura 2.18 apresentam-se os cromatogramas da separação PAR, FLU e CLO, enquanto na Figura 2.19 é apresentado o cromatograma dos antidepressivos DES, NOR, IMI, AMI. Dentre os sete compostos testados, o único pico que co-eluiria em uma aplicação para determinação simultânea desses compostos, seria o pico da FLU que sairia entre os picos da NOR e IMI. Como será observado no **Capítulo 4**, mesmo uma co-eluição um pouco mais extensa desses compostos não prejudicou a validação de um método baseado em LC-MS/MS.

Figura 2.18 Separação de PAR, FLU e CLO em cromatografia com *column switching* em escala *microbore*. (1) PAR, (2) FLU e (3) CLO.

Figura 2.19 Separação de DES, NOR, IMI e AMI em cromatografia com *column switching* em escala *microbore*. (1) DES, (2) NOR, (3) IMI e (4) AMI.

Outra aplicação, na qual surgiu interesse no decorrer dessa tese, foi a determinação de albendazol e seus principais produtos de biotransformação. O albendazol pode ser usado tanto no tratamento de humanos, quanto na medicina veterinária, por exemplo, com aplicações em bovinos. Um cromatograma de um método em desenvolvimento para avaliação desses compostos em plasma bovino é apresentado a seguir. Com esse método, consegue-se separar os dois produtos de biotransformação (sulfóxido e sulfona) e o fármaco inalterado. Nesse momento, encontra-se em desenvolvimento uma estratégia para redução do tempo de análise, a qual é baseada na troca de fase móvel por uma mais forte, após a eluição dos produtos de biotransformação. Em seguida, o método será validado e aplicado em amostras reais de um estudo de bioequivalência para desenvolvimento de uma formulação genérica veterinária. Durante os testes preliminares, para estabelecimento das melhores condições cromatográficas e de preparo de amostras, inúmeras injeções de plasma bovino e humano foram realizadas na coluna RAM, demonstrando grande robustez também na escala *microbore*.

Figura 2.20 Cromatograma ilustrando a separação dos anti-helmínticos em plasma bovino, usando um sistema *microbore*. (1) SOX, (2) SON, (3) ALB, (PI) MEB e (*) interferentes.

5 CONCLUSÃO

O método cromatográfico, em escala convencional, mostrou-se adequado para a análise de FLU em plasma humano. O pré-tratamento *online* da amostra biológica, baseado na coluna RAM-BSA-C18, requereu apenas 100 µL de plasma. Ambos os modos de *column switching* foram testados e mostraram perfis cromatográficos adequados, entretanto em *foreflush* uma proteção adicional para a coluna analítica é garantida. O método possibilitou um completo pré-tratamento da amostra (limpeza e concentração), somado à separação analítica, em uma corrida cromatográfica de apenas 20 minutos, no sistema bidimensional. O procedimento analítico automatizado usando uma coluna RAM-BSA-C18 *online* permitiu ensaios sem efeitos de matriz ou presença de interferentes; assim, a validação do método demonstrou linearidade, LQ, recuperação, precisão e exatidão adequados. Na escala *microbore*, a aplicação para análise de antidepressivos demonstrou grande potencialidade, especialmente se utilizada em acoplamento LC-MS. Além disso, a aplicação para análise de albandazol e seus produtos de biotransformação já apresentou resultados interessantes e promete ser adequada para aplicação em estudo com amostras veterinárias reais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.VLASE, L.; IMRE, S.; LEUCUTA, S. Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 659-663, 2005.
- 2.DUVERNEUIL, C.; DE LA GRANDMAISON, G. L.; DE MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J. C. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs. **Ther. Drug Monit.**, v. 25, n. 5, p. 565-573, 2003.
- 3.TITIER, K.; CASTAING, N.; SCOTTO-GOMEZ, E.; PEHOURCQ, F.; MOORE, N.; MOLIMARD, M. High-performance liquid chromatographic method with diode array detection for identification and quantification of the eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. **Ther. Drug Monit.**, v. 25, n. 5, p. 581-587, 2003.
- 4.LLERENA, A.; DORADO, P.; BEREZ, R.; GONZALEZ, A.; NORBERTO, M. J.; DE LA RUBIA, A.; CACERES, M. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients. **J. Chromatogr. B**, v. 783, n. 1, p. 25-31, 2003.
- 5.SABBIONI, C.; BUGAMELLI, F.; VARANI, G.; MERCOLINI, L.; MUSENGA, A.; SARACINO, M. A.; FANALI, S.; RAGGI, M. A. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 36, n. 2, p. 351-356, 2004.
- 6.LI, K. M.; THOMPSON, M. R.; MCGREGOR, I. S. Rapid quantitation of fluoxetine and norfluoxetine in serum by micro-disc solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr. B**, v. 804, n. 2, p. 319-326, 2004.
- 7.MARTÍNEZ, M. A.; SÁNCHEZ DE LA TORRE, C.; ALMARZA, E. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluoxetine, amitriptyline, nortriptyline, trimipramine, maprotiline, clomipramine, and trazodone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J. Anal. Toxicol.**, v. 27, p. 353-358, 2003.
- 8.LANTZ, R. J.; FARID, K. Z.; KOONS, J.; TENBARGE, J. B.; BOPP, R. J. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by capillary gas chromatography with electron-capture detection. **J. Chromatogr. B**, v. 614, n. 1, p. 175-179, 1993.

9. CRIFASI, J. A.; LE, N. X.; LONG, C. Simultaneous identification and quantitation of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in biological samples by GC-MS. **J. Anal. Toxicol.**, v. 21, n. 6, p. 415-419, 1997.
10. LI, C.; JI, Z.; NAN, F.; SHAO, Q.; LIU, P.; DAI, J.; ZHEN, J.; YUAN, H.; XU, F.; CUI, J.; HUANG, B.; ZHANG, M.; YU, C. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of fluoxetine and its main active metabolite norfluoxetine in human plasma with deuterated fluoxetine as internal standard. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 16, n. 19, p. 1844-1850, 2002.
11. GUO, X.; FUKUSHIMA, T.; LI, F.; IMAI, K. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in rat plasma by HPLC with pre-column derivatization and fluorescence detection. **Biomed. Chromatogr.**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2003.
12. EL-DAWY, M. A.; MABROUK, M. M.; EL-BARBARY, F. A. Liquid chromatographic determination of fluoxetine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, n. 3, p. 561-571, 2002.
13. MAJORS, R. E.; BOOS, K. S.; GRIMM, C. H.; LUBDA, D.; WIELAND, G. Practical guidelines for HPLC: integrated sample preparation using column switching. **LC-GC**, v. 14, n. 7, p. 554-560, 1996.
14. THEODORIDIS, G.; PAPADOYANNIS, I. N. Modern sample preparation methods in chemical analysis. **Mikrochim. Acta**, v. 136, n. 3-4, p. 199-204, 2001.
15. KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.
16. SMITH, R. M. Before the injection: modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, 2003.
17. PINKERTON, T. C. High-performance liquid-chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. **J. Chromatogr.**, v. 544, n. 1-2, p. 13-23, 1991.
18. CAMPINS-FALCO, P.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. **J. Chromatogr. B**, v. 619, n. 2, p. 177-190, 1993.
19. ANDERSON, D. J. High-performance liquid-chromatography: direct injection techniques. **Anal. Chem.**, v. 65, n. 12, p. R434-R443, 1993.

- 20.SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004.
- 21.MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
- 22.CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; PEDRAZOLLI, J. Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 766, n. 1, p. 153-160, 2001.
- 23.CASS, Q. B.; GOMES, R. F.; CALAFATTI, S. A.; PEDRAZOLLI, J. Determination of amoxycillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 987, n. 1-2, p. 235-241, 2003.
- 24.CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; WAINER, I. W. Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography. **Chirality**, v. 14, n. 9, p. 731-735, 2002.
- 25.BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- 26.CASS, Q. B.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; PEDRAZZOLI, J. Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching. **J. Chromatogr. B**, v. 798, n. 2, p. 275-281, 2003.
- 27.SANTOS NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F. M. Capillary column switching restricted-access media-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry system for simultaneous and direct analysis of drugs in biofluids. **Anal. Chem.**, 2007. In press. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac070671g>>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- 28.SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **J. Chromatogr. A**, v. 1105, n. 1-2, p. 71-76, 2006.

29. HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; CHEVALIER, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; LAURENTIE, M.; NIVET, J. C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, n. 2, p. 135-148, 1999.

30. BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms recovery and apparent recovery in analytical procedures: (IUPAC Recommendations 2002). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 11, p. 2201-2205, 2002.

CAPÍTULO 3

Microcolumn switching RAM-LC-UV para análise de fluoxetina em plasma

“Really great people make you feel that you, too, can become great.”

Mark Twain

1 INTRODUÇÃO

A análise de fluidos biológicos por injeção direta em um sistema de *microcolumn switching* com coluna RAM e analítica capilares empacotadas é uma abordagem elegante. Ela une a capacidade de automatização de um sistema de *column switching*, a capacidade excludente/extratora da coluna RAM e as vantagens da cLC. Em aplicações bioanalíticas, o menor consumo de solventes e amostras, associado com maior sensibilidade e automatização, têm crescido em interesse. Ainda assim, a única publicação encontrada utilizando cLC para análise de FLU precisou de preparo de amostras baseado em técnica tradicional, por não contar com uma estratégia para injeção direta da amostra.¹ Mullett et al.² apresentaram um sistema de microextração em fase sólida “no tubo” (*in-tube* SPME) baseado em uma micro coluna RAM para a extração de fármacos em soro. Entretanto, nesse trabalho eles acoplaram o sistema de preparo de amostras desenvolvido com a HPLC em escala convencional.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi desenvolver um simples, *online* e biocompatível sistema cLC com *microcolumn switching*, baseado em colunas RAM, para o preparo e análise de fluoxetina em amostras de plasma humano. Com esse trabalho buscou-se avaliar a viabilidade da utilização de coluna RAM acoplada por *column switching* e usando a escala capilar em ambas as colunas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Padrões analíticos de CLO, usada como padrão interno, e FLU foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Acetato de amônio e ácido acético (grau analítico) foram obtidos de Mallinckrodt (Paris, EUA), enquanto trietilamina (TEA) com a mesma pureza foi comprada de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). ACN e MeOH, grau HPLC, também foram adquiridos de Mallinckrodt. A água utilizada no trabalho foi purificada em uma estação Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA), e as membranas hidrofílicas de 0,45 µm utilizadas foram obtidas da mesma empresa. Albumina sérica bovina (BSA) (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), borohidreto de sódio (VETEC, RJ, Brasil) e solução aquosa de glutaraldeído 25% (J.T. Baker), grau reagente, foram empregadas no preparo da coluna RAM-BSA-C18.

O material de empacotamento usado na coluna analítica foi a sílica com fase ligada C18 Phase Sep Stable pH, com 3 µm de diâmetro de partículas, obtido de Phase Separations (Norwalk, EUA). O material de empacotamento de um cartucho C18 Chromobond (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) foi usado na pré-coluna sendo, posteriormente, modificado para RAM. Tubos de aço inoxidável internamente recobertos por sílica fundida (520 µm de *i.d.*), conexões do tipo *end-fitting* e *frits* de aço inoxidável (2 µm) foram adquiridos de Alltech (IL, EUA). Plasma livre de fármacos foi gentilmente doado pela Santa Casa de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Plasma proveniente de diversos doadores foi avaliado para a checagem de interferentes.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR COM *COLUMN SWITCHING*

O sistema de *column switching* cLC foi constituído de cromatógrafo Shimadzu série LC-10Avp (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-10Ai, um desgaseificador DGU-14A, um detector UV-Vis SPD-10Avp equipado com uma cela semi-micro, um amostrador automático SIL-10Avp e uma interface controladora SCL-10Avp. Adicionalmente, uma bomba seringa Phoenix 40 (CE Instruments, Rodano, Itália) foi utilizada. Todos os componentes do sistema foram adequadamente acoplados a uma válvula *microbore* Cheminert de seis portas e duas posições (Valco, Houston, TX, EUA). Um atuador microeletrônico Valco controlou a posição da válvula e todo o sistema foi comandado pelo software Class-VP (Shimadzu).

As duas bombas LC-10Ai foram conectadas, por meio de um “T”, ao amostrador automático. Um tubo de PEEK (127 μm de *i.d.*), com um volume de 1,5 μL , substituiu a alça de amostragem padrão de 100 μL do amostrador. A saída do amostrador automático foi conectada à porta 1 da válvula seletora de colunas. A coluna RAM foi conectada entre as portas 3 e 6 da válvula. A bomba seringa foi ligada na porta 4, enquanto a coluna analítica (100 mm x 520 μm) foi conectada à porta 5 e um tubo de descarte à porta 2. O arranjo instrumental e as posições de ligação na válvula seletora são esquematizados na Figura 3.1. Uma fotografia do sistema montado, e outra contendo detalhe da válvula com as colunas, são apresentadas respectivamente nas Figuras 3.2 e 3.3.

Figura 3.1 Configuração do sistema de *column switching* com arranjo de colunas capilares analítica e RAM.

Figura 3.2 Fotografia do sistema de *microcolumn switching* desenvolvido nessa parte do trabalho.

Figura 3.3 Detalhe do amostrador automático e da válvula seletora de colunas contendo as colunas capilares.

3.3 PREPARO DAS COLUNAS

Para preparar as colunas, um protocolo recentemente descrito por Lanças et al. foi seguido.³ A Figura 3.4 esquematiza o sistema de empacotamento utilizado. Para empacotar colunas capilares sob condições supercríticas um lado do tubo foi conectado a um reservatório contendo quantidade apropriada de material de empacotamento. O outro lado foi conectado a uma união contendo um *frit* de aço inoxidável (2 μm), para reter o material de empacotamento dentro do tubo. Ao outro lado dessa união, um pedaço de tubo de sílica fundida (12 μm de *i.d.* e 20 cm de comprimento) foi conectado para atuar como restritor e manter a pressão de 18 MPa, necessária para o CO_2 permanecer no estado supercrítico. A coluna e o reservatório de fase estacionária foram imersos em um banho de ultra-som durante o procedimento de empacotamento, sendo a temperatura conservada a 50 °C para manter as condições supercríticas. Após o empacotamento, esperou-se a depressurização espontânea do sistema, pois a sua abertura imediata causaria refluxo do material de empacotamento e afetaria a estrutura do leito cromatográfico, resultando na diminuição da eficiência da coluna.

Figura 3.4 Esquema do sistema de empacotamento por CO_2 supercrítico. (1) cilindro de gás CO_2 , (2) bomba seringa, (3) válvula agulha, (4) válvula de 3 vias, (5) reservatório para as partículas de fase estacionária, (6) coluna cromatográfica, (7) restritor e (8) banho de ultra-som aquecido.

Para a obtenção da coluna RAM-BSA, um tubo capilar (50 mm x 520 μm) foi empacotado, como descrito acima, com partículas C18 de 45 μm . Seguindo um protocolo descrito na literatura,⁴ o material de empacotamento da coluna foi modificado *in situ*. Pequenas adaptações do protocolo foram feitas para facilitar o procedimento, como por exemplo, todos os reagentes foram impulsionados por N_2 pressurizado. A coluna C18 foi condicionada por duas horas com MeOH a uma vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$. Em seguida percolou-se tampão fosfato de potássio 0,05 mol L^{-1} (pH 6,0) por 20 minutos, seguido por uma solução de BSA a 1,0 mg mL^{-1} preparada no mesmo tampão, por mais 20 minutos. Esse procedimento foi seguido pela passagem de água Milli-Q por 10 minutos e, então, solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v) por 5 minutos. Após 5 horas de repouso, a coluna foi lavada por 5 minutos com solução de borohidreto de sódio a 1 mg mL^{-1} e, após 2 horas, condicionada com água Milli-Q. A Figura 3.5 mostra fotografia das colunas capilares preparadas.

3.4 PREPARO DE AMOSTRAS E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O amostrador automático foi configurado para injetar 15 μL de amostra, quantidade suficiente para preencher completamente a alça de 1,5 μL . Inicialmente a bomba A impulsionou água a 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ através do sistema de injeção e da coluna RAM. Simultaneamente, a bomba seringa dispensava 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ da fase móvel de eluição através da coluna analítica. Após um tempo adequado, o software Class-VP controlou o sistema para executar as rotinas de preparo de amostras e análise. A Tabela 3.1 mostra a sequência de eventos otimizada para a análise.

Figura 3.5 Fotografia das colunas capilares de 520 μm de *i.d.* empacotadas para uso no sistema de *microcolumn switching*. Acima a coluna analítica e abaixo dessa a coluna RAM.

Tabela 3.1 Programação de eventos do software Class-VP para a execução automatizada das etapas de preparo de amostras e separação analítica.

Tempo (min)	Evento
0 a 8,00	Condições iniciais: Bomba A: vazão = $50 \mu\text{L min}^{-1}$.
8,00 a 8,50	Bomba A diminui a vazão gradativamente até zero.
8,51	Válvula seletora de colunas gira para a posição B.
10,50	Válvula seletora retorna à posição A.
10,51 a 11,00	Bomba B aumenta a vazão de zero para $50 \mu\text{L min}^{-1}$.
11,00	Amostrador automático realiza autolavagem.
14,00 a 14,50	Bomba A aumenta vazão para $50 \mu\text{L min}^{-1}$ enquanto bomba B diminui para zero.
25,00	Sistema finaliza a corrida e prepara nova injeção.

A água, bombeada pela bomba A, excluiu as macromoléculas do plasma. Após tempo suficiente, uma fase móvel composta por mistura 70:30 de ACN:tampão acetato de amônio (7 mmol L^{-1}) + TEA (17 mmol L^{-1}) (pH 5,0) eluiu, em modo *backflush*, os analitos da coluna RAM para a coluna analítica. A mesma fase móvel foi mantida para promover a separação dos analitos na etapa analítica e detecção UV em 226 nm foi utilizada. Enquanto a coluna analítica separava os analitos, a coluna RAM era lavada com a mesma fase móvel, em modo *foreflush* e, então, recondicionada com água para a próxima corrida.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Soluções estoque de FLU e CLO (padrão interno) foram preparadas a 1 mg mL^{-1} em MeOH. Essas soluções foram diluídas para soluções intermediárias a $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e, então, para soluções de trabalho de FLU a $1,5$ e $0,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e de CLO a $1,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, também em MeOH.

Plasma humano foi centrifugado a $7100g$ e filtrado através de membranas hidrofílicas de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. De maneira a obter as concentrações de 20 , 40 , 100 , 180 , 300 e 500 ng mL^{-1} para FLU e 250 ng mL^{-1} para o padrão interno, alíquotas adequadas de soluções de trabalho foram transferidas para frascos tipo eppendorf. A seguir, essas alíquotas foram secas em uma secadora centrífuga a vácuo e ressuspensas em $1,0 \text{ mL}$ de plasma branco. Os frascos eppendorf foram agitados por 30 segundos e levados ao amostrador automático.

3.6 QUANTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO

O protocolo de validação foi adaptado do protocolo do FDA para aplicações bioanalíticas.⁵ Uma curva analítica nas seis concentrações mencionadas acima foi construída usando quatro replicatas em cada ponto. Nesse estudo, o intervalo de linearidade, a correlação, a precisão e o limite de quantificação foram avaliados. Quatro amostras de plasma branco foram também analisadas para avaliar possíveis interferentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro teste foi realizado para confirmar a exclusão das macromoléculas presentes no plasma. A coluna RAM foi diretamente conectada ao detector ajustado a 280 nm

(comprimento de onda de máxima absorção para albumina) e uma injeção de plasma branco foi impulsionada por água a $50 \mu\text{L min}^{-1}$. A Figura 3.6 mostra o perfil cromatográfico da exclusão das macromoléculas do plasma. Pela razão observada entre o pico do sinal na banda de exclusão das proteínas e o nível da linha de base após o retorno pode-se estimar que mais de 99% das proteínas foram eluídas após um período de 8 minutos, o qual foi utilizado para definir o tempo de limpeza na programação de eventos do sistema. O perfil cromatográfico obtido foi concordante com aquele mostrado no **Capítulo 2** para as escalas convencional e *microbore*, e que proporcionaram exclusão de aproximadamente 99%. A vazão utilizada na etapa de injeção e limpeza dos constituintes da matriz foi testada em 10, 20 e $50 \mu\text{L min}^{-1}$, usando água como fase móvel. Em cada vazão, a possível perda do analito foi avaliada pela injeção de plasma fortificado e observação da sua perda (*breakthrough*), posicionando o detector na saída da coluna. Não foi observada perda de analito em nenhuma vazão, indicando uma adequada extração dentro dos poros das partículas RAM-BSA-C18.

Figura 3.6 Cromatograma da exclusão das proteínas através de coluna RAM-BSA-C18 capilar sob vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ de água. Comprimento de onda = 280 nm.

Como a utilização de vazão a $50 \mu\text{L min}^{-1}$ proporcionou um tempo de exclusão mais curto e queda de pressão razoável, essa condição foi escolhida para utilização no método desenvolvido. A coluna RAM não apresentou entupimento em todo o estudo, contudo é importante destacar que a quantidade de solvente orgânico (ACN ou MeOH) da fase móvel não pode ser elevada a mais que 10-15%, até que as macromoléculas tenham sido eliminadas, do contrário isso causaria a precipitação das proteínas no interior da coluna e linhas de conexão do sistema. Outra etapa importante para evitar o entupimento do sistema é garantir que nenhum material particulado esteja presente na amostra a ser injetada.

Ambos os modos de *column switching* para preparo de amostras foram avaliados, *backflush* e *foreflush*. Em *foreflush* a coluna RAM foi conectada diretamente entre o sistema de injeção e o detector. Após 5 minutos, a fase móvel foi trocada de água para mistura 70:30 de ACN:tampão acetato de amônio (5 mmol L^{-1}) (pH 5,3), a $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Esse experimento foi conduzido para observar a influência apenas da coluna RAM sobre o alargamento dos picos cromatográficos, excluindo a participação da coluna analítica. Para avaliar o modo *backflush*, o sistema usado foi similar ao representado na Figura 3.1, entretanto, sem a coluna analítica entre a válvula seletora e o detector. Após 10 minutos de corrida, a válvula seletora foi girada para a posição B e os analitos foram eluídos usando a mesma fase móvel descrita no teste em *foreflush*. A comparação entre ambos os modos é mostrada na Figura 3.7: em *foreflush* a coluna RAM contribuiu com certa separação, contudo, os picos foram alargados devido à baixa eficiência da coluna, em comparação à coluna analítica. Por causa deste fato a utilização de *backflush* foi preferida. Esse resultado difere dos resultados mostrados no capítulo anterior, no qual a coluna RAM em *foreflush* não influenciou de sobremaneira a eficiência da separação e pôde ser usada no método validado.

Figura 3.7 Comparação entre os modos *backflush* e *foreflush* para a realização de *column switching*.

Para evitar efeito de memória, a coluna RAM foi submetida a uma etapa de limpeza entre cada corrida. Após a válvula seletora retornar à posição inicial (A), a mesma fase móvel de eluição foi bombeada pela bomba B através da coluna RAM. A Figura 3.8 ilustra a inexistência de efeito de memória após essa etapa de limpeza. Nesse experimento, plasma fortificado com FLU e CLO foi injetado, seguido de uma injeção de plasma branco, e nenhum pico foi observado no tempo de retenção dos compostos de interesse.

Figura 3.8 Cromatograma do teste para verificação do efeito de memória.

Para otimizar as condições cromatográficas, diversas misturas de solventes foram avaliadas como fase móvel. Observou-se que a concentração de TEA tem um efeito significativo, diminuindo o tempo de retenção dos analitos. Assume-se que essa redução na interação dos analitos com a fase estacionária é causada pela competição exercida pela TEA sobre os sítios ativos dos grupos silanóis residuais.⁶ ACN também contribuiu para a redução no tempo de retenção, além de reduzir a viscosidade da fase móvel, conseqüentemente reduzindo a queda de pressão da coluna. Entretanto, um aumento muito grande na concentração de ACN levou a picos menos simétricos, uma vez que a TEA estava presente apenas na fase aquosa, tendo diminuída a sua concentração com o aumento de ACN na mistura. Um bom compromisso entre queda de pressão na coluna, simetria dos picos, adequada retenção e resolução dos picos foi encontrada usando a fase móvel descrita na seção 3.4. A Figura 3.9 mostra um cromatograma típico obtido de uma injeção de plasma fortificado, sob as condições otimizadas. Após a injeção de plasma branco e fortificado e a comparação com outras metodologias desenvolvidas no laboratório, concluiu-se que esse tipo de abordagem apresenta menos interferentes que as extrações por LLE e SPE. Adicionalmente, essa abordagem capilar de *column switching* apresentou precisão e LQ similar àqueles da escala convencional, mostrados no capítulo anterior. O efeito de matriz foi avaliado pela recuperação aparente ou relativa, injetando-se plasma fortificado e soluções de padrão em concentrações iguais (100 e 500 ng mL⁻¹). Nenhum efeito de matriz foi observado, uma vez que as áreas obtidas para os padrões e o plasma fortificado foram iguais. Por outro lado, a recuperação absoluta do método é difícil de ser avaliada, uma vez que a coluna extratora é parte inerente do sistema cromatográfico e se removida modificaria significativamente o perfil cromatográfico da separação.

Figura 3.9 Cromatograma de uma injeção de plasma fortificado com FLU a 100 ng mL^{-1} .

Em trabalhos prévios de Markides et al.^{7,8} e Greibrokk et al.,¹ usando cLC, picos mais estreitos do que os conseguidos nesse trabalho foram obtidos. O sistema de detecção usado nesse trabalho foi equipado com cela semi-micro, sendo a principal fonte de alargamento dos picos, devido ao seu grande volume interno. Apesar de tudo, uma breve validação foi realizada para a análise de fluoxetina em plasma e um coeficiente de correlação de 0,998 foi obtido para o intervalo entre 20 e 500 ng mL^{-1} . O LQ obtido foi 20 ng mL^{-1} , similar ao observado no capítulo anterior com colunas convencionais. Além disso, adequada precisão foi obtida, como apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Precisão observada durante a validação do método.

Concentração (ng mL^{-1})	Precisão RSD (%) (n = 4)
20	20,3
40	17,9
100	14,6
180	8,4
300	2,4
500	1,6

5 CONCLUSÃO

O sistema desenvolvido mostrou-se uma atrativa possibilidade para o preparo de amostra e a análise totalmente automatizada de FLU em plasma. Ele permitiu economia de tempo e solventes, bem como reduziu o contato com o material biológico. Esse trabalho demonstrou que a abordagem com colunas RAM, amplamente usada na escala convencional, é também apropriada para operar em micro escala. O sistema desenvolvido ainda precisa de melhorias, principalmente relacionadas à redução no volume morto, o qual pode ser obtido com a utilização de uma cela capilar para detecção UV, de interface ESI para acoplamento com espectrometria de massas, ou de uma cela capilar para detecção eletroquímica. Adicionalmente, uma redução no volume das conexões, válvulas, *frits*, e linhas é ainda requerida. O presente estudo conseguiu demonstrar que a utilização de *column switching* com colunas RAM e cLC pode ser uma interessante abordagem para analisar FLU em plasma, e que pode ser estendida para outras aplicações. Em pesquisa bibliográfica realizada no momento da execução desse projeto, esse foi o primeiro trabalho a empregar abordagem totalmente capilar com colunas RAM. Assim, ainda existem diversos aspectos a serem estudados e desenvolvidos com relação à abordagem, incluindo a melhoria da instrumentação (possivelmente com o desenvolvimento de equipamento dedicado, enfoque este sendo utilizado por outros estudantes do grupo), desenvolvimento de colunas RAM capilares, uma validação completa da metodologia e a aplicação em estudos mais complexos. Alguns desses aspectos foram observados em etapas posteriores do projeto que originou essa tese e são apresentados no próximo capítulo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma by temperature-programmed packed capillary liquid chromatography with on-column focusing of large injection volumes. **J. Chromatogr. B**, v. 766, n. 1, p. 77-87, 2002.
- 2.MULLETT, W. M.; LEVSEN, K.; LUBDA, D.; PAWLISZYN, J. Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. **J. Chromatogr. A**, v. 963, n. 1-2, p. 325-334, 2002.
- 3.LANCAS, F. M.; RODRIGUES, J. C.; FREITAS, S. D. Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques. **J. Sep. Sci.**, v. 27, n. 17-18, p. 1475-1482, 2004.
- 4.MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
- 5.U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry**: bioanalytical method validation. Rockville: Drug Information Branch, 2001. 22 p.
- 6.SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley, 1997. 765 p.
- 7.BERGSTROM, S. K.; MARKIDES, K. E. On-line coupling of microdialysis to packed capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry demonstrated by measurement of free concentrations of ropivacaine and metabolite from spiked plasma samples. **J. Chromatogr. B**, v. 775, n. 1, p. 79-87, 2002.
- 8.SWART, R.; KOIVISTO, P.; MARKIDES, K. E. Column switching in capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantitation of pg/ml concentrations of the free basic drug tolterodine and its active 5-hydroxymethyl metabolite in microliter volumes of plasma. **J. Chromatogr. A**, v. 828, n. 1-2, p. 209-218, 1998.

CAPÍTULO 4

***Microcolumn switching* RAM-LC-MS/MS para análise simultânea de fármacos em fluidos biológicos**

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’ but ‘hmm.... that's funny...’”

Isaac Asimov

1 INTRODUÇÃO

A cLC tem conhecidas vantagens (por exemplo, maior sensibilidade com detectores sensíveis à concentração e menor consumo de amostra, solventes e fase estacionária) em relação à escala convencional.¹ Entretanto, para uma boa transição da HPLC convencional para a cLC, deve-se seguir um fator de redução de escala proporcional ao quadrado do raio da coluna ($f = r_{\text{conv}}^2 / r_{\text{capilar}}^2$).² Desse modo, a afirmação que a cLC apresenta melhor sensibilidade, usando detecção sensível à concentração, somente pode ser considerada verdadeira se quantidades proporcionalmente maiores de amostra forem carregadas no sistema.³ Tendo em mente o fator de redução de escala, o qual requer redução no volume de injeção, um maior carregamento da amostra só pode ser obtido usando focalização na coluna. Essa abordagem já foi revisada por Vissers et al.,⁴ e pode ser obtido usando focalização no topo da coluna analítica ou em configuração com troca de colunas (*column switching*).

Demandas na área farmacêutica e de ciências da vida têm direcionado para o desenvolvimento de novas estratégias para o preparo de amostras para técnicas cromatografias. Análise de fármacos em fluidos biológicos usando LC acoplada à MS é susceptível ao tipo de preparo de amostras e uma eliminação incompleta do efeito de matriz pode atrapalhar a aplicabilidade de um método.⁵⁻¹⁰ Assim, o desenvolvimento de técnicas modernas e eficientes para o preparo de amostras tem sido considerado uma etapa importante.^{11,12} Diferentes formas de preparo de amostras têm sido estudadas em função do efeito de matriz.¹³⁻¹⁵ Para a maioria dos fármacos a ionização por ESI é, ainda, a mais sensível; contudo ela tem sido relatada como a mais susceptível aos efeitos de supressão, qualquer que seja o preparo de amostras empregado.¹³ Colunas RAM podem ser usadas em modo unidimensional, atuando também como coluna analítica; ou em modo bidimensional usando *column switching*, esse último permitindo injeções mais rápidas de maior volume de amostra e resultando em menor número

de interferentes.¹⁶ ESI operando em baixas vazões (poucos microlitros por minuto) usualmente comporta-se como um detector sensível à concentração.¹⁷ Dessa forma, combinar as vantagens da cLC em *column switching* utilizando colunas RAM com a ESI-MS parece ser uma alternativa atrativa às atuais técnicas e métodos de análise de fármacos em amostras complexas.

O desenvolvimento da análise de fármacos em fluidos biológicos, muitas vezes intentando alta produtividade (*high throughput*), tem sido marcadamente promovido pelo uso das técnicas de LC-MS e LC-MS/MS.^{18,19} As primeiras configurações das interfaces de ESI eram operadas em vazões diferentes daquelas usadas em HPLC convencional.^{20,21} Dessa forma, o desenvolvimento de novas interfaces capazes de lidar com as altas vazões da HPLC convencional foi estimulado. Em analogia, a HPLC também buscou a redução na escala, de modo a evitar grandes divisões de vazão (*split*), para operar em acoplamento com a MS. Devido a algumas limitações em ambas as técnicas, o desenvolvimento de *microbore* LC-ESI-MS tornou-se o formato padrão para esse tipo de acoplamento. Contudo, a eficiência do ESI é melhorada em vazões ainda mais baixas, devido a formação de gotículas carregadas de menor diâmetro.²² Interessantemente, por algum tempo não houve interesse comercial em reduzir a escala da LC para um melhor acoplamento com a MS. Em uma revisão de Gelpi,¹⁸ a maioria das aplicações biomédicas usando LC-MS empregava colunas convencionais ou *microbore*. Mais recentemente, a alta demanda da proteômica por técnicas altamente sensíveis, e com baixo consumo de amostras, levou ao desenvolvimento de equipamentos comerciais de cLC e nano-LC. Apesar de bem estabelecida na área de proteômica,²³⁻²⁷ a miniaturização da LC para a análise de fármacos em fluidos biológicos ainda não seguiu a mesma tendência. Talvez a dificuldade em tratar as matrizes biológicas em condições microfluídicas seja um obstáculo, ou mesmo a existência da escala *microbore*, que permite resultados razoáveis, tenha garantido certo contentamento. Entretanto, pensando em outra direção, a instrumentação disponível

atualmente para LC permite uma transição segura para a escala capilar e nano. Além disso, o futuro da área farmacêutica demanda por ferramentas analíticas mais sensíveis e capazes de lidar e consumir pequenas quantidades de amostras.

Swart et al.²⁸ desenvolveram um sistema de *column switching* LC-LC-MS/MS para concentração de amostras ultrafiltradas. Cai e Henion²⁹ acoplaram LC de imunoafinidade em escala *microbore* com cLC-MS/MS para amostras de urina. Em uma revisão de Saito e Jinno³⁰ algumas aplicações SPE *online* e LC com microcolunas foram apresentadas, mas nenhuma aplicação compreendendo um sistema totalmente capilar foi utilizada na análise de amostras de plasma. Em uma interessante abordagem, Liu et al.³¹ analisaram amostras de plasma em um sistema cLC; entretanto eles precisaram realizar preparo de amostras *off-line* por precipitação de proteínas e SPE em pontas de pipeta. Análise rápida de bioamostras foi obtida por Hsieh et al.³² usando LC-MS/MS com colunas monolíticas em escala convencional. Chistiaens et al.³³ desenvolveram um sistema RAM-LC-MS/MS *microbore* para análise de plasma humano. Lanckmans et al.³⁴ demonstraram vantagens práticas do uso de cLC e nano-LC para quantificação de moléculas pequenas; contudo eles tiveram problemas de efeito de matriz com amostras biológicas, e tiveram que usar microdiálise como forma de preparo de amostras. Finalmente, Suenami et al.³⁵ usaram SPE-LC-MS/MS capilar; entretanto, eles não incluíram o uso de RAM. Adicionalmente, como as colunas analíticas tinham 520 µm de *i.d.*, aquela análise consumiu 10 µL de amostra, requerendo injeção e lavagem manual.

2 OBJETIVO

Essa parte do trabalho apresenta, pela primeira vez, a abordagem RAM-LC-ESI-MS/MS totalmente capilar para análise direta e simultânea de amostras biológicas contendo fármacos e produtos de biotransformação. A focalização dos picos e o preparo de amostras

foram realizados em um simples arranjo de *column switching*. Esforços foram direcionados ao desenvolvimento de um sistema com eficientes colunas extratoras reutilizáveis, capazes de tolerar a injeção de amostras contendo matriz biológica. O efeito de matriz foi avaliado sobre a extração, e sobre o ESI. Dessa forma o desempenho do sistema RAM-LC-ESI-MS/MS foi testado na separação e adequada detecção de diferentes compostos, permitindo a validação da metodologia para a análise de um grupo de cinco antidepressivos e de um grupo contendo alendazol e seus produtos de biotransformação (sulfóxido e sulfona).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os materiais de empacotamento avaliados como RAM foram Lichrospher ADS-C18 e XDS, com 25 μm , e poro de 60 Å (Merck, Darmstadt, Alemanha); Semi-Permeable Surface (SPS), com 5 μm , e poro de 100 Å (Regis Technologies, Morton Grove, IL, USA); e a fase BSA-C18 (imobilizada em laboratório), com 10 μm , e poro de 100 Å. Os materiais de empacotamento usados para o preparo das colunas analíticas capilares foram YMC ODS-A e ODS-AQ, ambos com poro de 120 Å (YMC Europe, Schermbeck, Alemanha); Reprosil-Pur C18-AQ, com poro de 120 Å (Dr. Maisch, Alemanha); e Kromasil C-18, com poro de 120 Å (Eka Chemicals AB, Bohus, Suécia), todos com partículas de 5 μm . Todos os capilares de sílica fundida foram obtidos de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA). MeOH e ACN, grau *LiChrosolv*, bem como acetato de amônio, ácido acético, solução de amônia (25%), e 1,2-dicloroetano, grau analítico, foram adquiridos de Merck. Todas as soluções foram preparadas usando água purificada com um sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA). Padrões analíticos de DES, NOR, IMI, AMI, CLO, FLU, e FLU-d5 (padrão

pentadeuterado) formaram o grupo dos antidepressivos (ADs) e foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) na forma de sal cloridrato. Padrões analíticos de ALB, MEB, SOX e SON formaram o grupo dos anti-helmínticos (AHs) e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Demerval de Carvalho (UNAERP, Ribeirão Preto, Brasil).

3.2 PREPARO DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS DE PLASMA E URINA

Plasma humano foi obtido de doadores-controle saudáveis, por meio do banco de sangue do Hospital Universitário (Uppsala, Suécia), sendo estocado a -80 °C antes do uso. Urina humana foi coletada de um doador masculino e estocada a 4 °C por até 24 horas antes do uso.

Soluções estoque de cada antidepressivo foram preparadas em ACN a 1 mg mL⁻¹. Soluções intermediárias a 10 µg mL⁻¹ foram obtidas por diluição com ACN. O mesmo foi repetido para as soluções estoque e intermediárias de cada anti-helmíntico, mas a 100 e 1 µg mL⁻¹, respectivamente. Misturas a 1250 e 100 ng mL⁻¹ em ACN foram obtidas para cada grupo (ADs e AHs) misturando-se adequadas alíquotas de soluções estoque ou intermediária. Essas soluções foram mantidas a -20 °C. Soluções de trabalho dos padrões analíticos foram obtidas pela secagem de alíquotas adequadas das misturas em um sistema *SpeedVac* (ISS110, Savant Instruments, Holbrook, NY, EUA) a uma taxa média de secagem. Os padrões de trabalho foram então ressuspensos na matriz adequada (plasma, urina, ou água) por agitação em vórtex. Essa etapa foi seguida pela diluição 1:2 em água, se não estabelecido de outra maneira. Em seguida as soluções foram centrifugadas a 14926g por 10 minutos em uma centrífuga Biofuge 13 (Heraeus Sepatech, Osterode, Alemanha). Quando não estavam sendo usadas, essas soluções foram mantidas a 4 °C por um curto tempo (máximo 3 dias). Soluções novas foram preparadas antes do início de cada novo estudo.

Para os testes de temperatura de incubação e filtração das amostras, alíquotas de plasma e água (4 exemplares de cada matriz) foram fortificadas a 60 ng mL^{-1} , como descrito. Um conjunto de alíquotas (2 exemplares de cada matriz) foi mantido a 37°C por 30 minutos em um bloco de aquecimento (Techne Dri-Block DB-2D, Cambridge, UK), enquanto o outro conjunto foi mantido pelo mesmo tempo a 20°C (temperatura ambiente). Depois disso, um subconjunto (1 exemplar de cada matriz), de cada um de ambos os conjuntos anteriores, foi centrifugado, enquanto o outro subconjunto foi filtrado através de um filtro de seringa hidrofílico de acetato de celulose ($13 \text{ mm} \times 0,2 \mu\text{m}$, Lida Manufacturing, Kenosha, WI, EUA). As amostras foram então diluídas 1:1 com água, e mantidas em suas respectivas temperaturas até o momento da injeção no sistema RAM-LC-MS (cada uma foi injetada em duplicata).

Para o teste de *loading* da coluna extratora, soluções de padrões foram preparadas, como descrito acima, de forma a obter-se crescentes quantidades de massas no intervalo de 83 pg até 4 ng, para cada analito. O volume injetado nesse estudo foi de $1 \mu\text{L}$. Na validação dos métodos, soluções foram preparadas para cobrir, com pelo menos 6 pontos, o intervalo de linearidade investigado. Os LDs foram calculados como três vezes a S/N e os LQs como tendo pelo menos dez vezes a S/N, com precisão melhor que 20%. A precisão, recuperação aparente e exatidão foram avaliadas em três níveis usando-se quintuplicatas em três dias consecutivos.

3.3 PREPARO DAS COLUNAS CAPILARES

Diferentes tipos de colunas foram preparados usando capilares de sílica fundida com 200, 250, e $320 \mu\text{m}$ de *i.d.*, como descrito abaixo. Com exceção da RAM-BSA-C18, preparada em capilares de $320 \mu\text{m}$, as outras colunas RAM foram preparadas com tubos de $200 \mu\text{m}$ de *i.d.*, por sua vez, as colunas analíticas foram preparadas com 200 e $250 \mu\text{m}$ de *i.d.*

Frits com aproximadamente 0,2 mm de comprimento foram colocadas dentro dos capilares pela punção de suas pontas contra um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/A, W & R Balston, UK) apoiado sobre uma superfície dura e lisa. Capilares com 50 µm de *i.d.* foram usados para inserir e reter os *frits* a aproximadamente 3 mm do topo das colunas. Capilares com 184 µm de *o.d.* foram acoplados com tubos de 200 µm de *i.d.*, enquanto capilares com 200 µm de *o.d.* foram acoplados aos tubos de 250 e 320 µm de *i.d.* Uma gota de resina epóxi (Araldite Hobby 10 min., Brascola, São Paulo, Brasil) foi usada para fixar a junção entre o tubo capilar da coluna e o capilar conector de sua saída. Diversos *hardwares* de colunas puderam ser preparados em um tempo razoável, e foram deixados de um dia para o outro para uma cura completa da resina. Uma bomba Jasco (modelo PU-980, Tokyo, Japão) impulsionou MeOH como solvente de empacotamento. *Hardwares* de colunas vazios (cerca de 20 cm de comprimento) foram conectados a um reservatório de empacotamento, o qual, então, foi preenchido com a suspensão de partículas de empacotamento (*slurry*). As suspensões foram preparadas com 8 mg de material de empacotamento sonicado por 1 minuto em 200 µL de 1,2-dicloroetano. Partículas ADS e XDS, exclusivamente, foram suspensas em MeOH devido a sua melhor molhabilidade nesse solvente. Usando uma vazão de 0,2 mL min⁻¹ a pressão do sistema de empacotamento foi elevada gradativamente até atingir 320 bar, sendo mantida constante por uma hora. O conjunto de empacotamento (coluna e reservatório) foi sonicado durante todo o procedimento, usando-se um banho de ultra-som Elma Transsonic Digital S (Singen, Alemanha) a 100% de potência. No caso das colunas RAM, elas foram empacotadas por 30 minutos sob 250 bar. A Figura 4.1 apresenta fotografias do sistema de empacotamento utilizado. Depois de empacotadas as colunas foram cortadas no comprimento correto. No caso das colunas analíticas, apenas 0,2 mm da extremidade foi cuidadosamente desempacotado usando o refletor aquecido de um aquecedor do tipo *heat gun* (Ungar/Weller modelo 6966B, Apex, NC, EUA) e, então, preenchidas com um pedaço de filtro de fibra de vidro como

descrito acima. A Figura 4.2 mostra algumas colunas RAM e analíticas preparadas. As partículas RAM não foram facilmente desempacotadas apenas pelo aquecimento e o leito empacotado teve que ser cuidadosamente seco na extremidade e, então, desempacotado batendo-se na extremidade do capilar com um pedaço de folha de papel dobrado duas vezes. As colunas RAM tiveram 3 mm de sua extremidade desempacotadas resultando em um leito de comprimento adequado. Depois disso, outro conector capilar (50 μm de *i.d.*) foi inserido e colado, retendo um *frit*. A segunda versão de colunas RAM-ADS empregou capilares de sílica fundida de 0,5 mm de comprimento (153 μm de *o.d.* x 20 μm de *i.d.*), no lugar do filtro de fibra de vidro, previamente usado como *frit*. A extremidade das colunas foi desempacotada como descrito acima. Então, capilares pré-cortados (153 μm *o.d.*) foram cuidadosamente introduzidos até a fissura causada pelo cortador de cerâmica; depois disso, o curto seguimento do capilar foi liberado no interior da coluna flexionando-se os capilares em um ângulo de 90° e puxando-se cada capilar aparte. Um capilar de sílica fundida com 184 μm de *o.d.* e 50 μm de *i.d.* foi colocado segurando apertadamente o pequeno capilar interno e colado com resina epóxi. Um esquema dos arranjos de *hardware* desenvolvidos é detalhado na Figura 4.3.

Figura 4.1 Fotografia do sistema usado do empacotamento das colunas capilares por *slurry*. (A) Bomba de HPLC e banho ultra-som contendo o conjunto de empacotamento. (B) Vista superior do banho de ultra-som contendo o reservatório do *slurry* e a coluna capilar.

Figura 4.2 Fotografia do tipo de *hardware* utilizado para a retenção do *frit* e preparo das colunas capilares (esquerda), e colunas analíticas e RAM preparadas (direita).

Para o preparo da coluna RAM-BSA-C18, inicialmente uma coluna capilar (320 μm de *i.d.* x 15 mm de comprimento) foi empacotada usando Kromasil C-18, poro 120 Å e partículas de 10 μm . O *hardware* empregado foi construído como descrito acima, mas a coluna foi empacotada sob condições supercríticas com CO_2 e modificada *in situ* como descrito na referência 36.

Figura 4.3 Arranjo instrumental do sistema de *column switching* LC-ESI-MS/MS. O modo *backflush* (ou seja, com inversão de coluna) está esquematizado na válvula seletora e as duas possibilidades de *hardware* para colunas RAM desenvolvidas nesse trabalho (*frit* feito com filtro de fibra de vidro e sem *frit*) estão ilustradas no detalhe.

3.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXCLUSÃO

Uma bomba Jasco PU-980 impulsionando água sob uma vazão de 20 e 40 $\mu\text{L min}^{-1}$ foi conectada a uma válvula de injeção manual de seis vias (C6W, Valco Instruments, Houston, TX, EUA) equipadas com uma alça de amostragem capilar externa de 1 μL . As colunas extratoras foram conectadas entre essa válvula e um detector Jasco UC-975 (280 nm) equipado com uma cela capilar de detecção (modelo UZ-JA97-CAP) da LC Packings (Amsterdã, Holanda). Para medir o sinal da quantidade total de proteína injetada no sistema a coluna extratora foi substituída por um pedaço de capilar de sílica fundida (300 mm x 50 μm de *i.d.*).

3.5 TESTE DE INJEÇÃO EM FLUXO E EM COLUNA NO MODO UNIDIMENSIONAL

O teste de injeção em fluxo foi realizado conectando-se um capilar de sílica fundida (250 mm x 50 μm de *i.d.*) entre uma válvula manual com alça de amostragem interna (C14W, Valco) e a fonte ESI. A válvula foi usada com alça interna de 60 ou 500 nL, e o sinal foi adquirido em modo de monitoramento de íon selecionado (SIM), pelo sistema de MS. No modo de separação unidimensional, uma coluna analítica foi diretamente conectada na válvula injetora e seu conector capilar de saída (50 μm de *i.d.*) no ESI.

3.6 CROMATOGRAFIA

Um tampão acetato de amônio/ácido acético 20 mM, pH 5,4, foi calculado usando o programa PHoEBus (Analis, Orleans, França) e confirmado usando um pHmetro. Esse

tampão foi misturado com ACN obtendo-se 70% de solvente orgânico na composição da fase móvel. Para a etapa de limpeza da coluna extratora, água e eletrólito 20 mM composto de acetato de amônio/amônia, pH 7,4, foram testados, com a adição de até 10% de ACN. Também foi comparado o desempenho das colunas ADS e XDS na extração dos ADs e AHs, utilizando fase móvel 100% aquosa e adicionada de 10% de ACN e 20 mM de eletrólito. As fases móveis foram desgaseificadas diariamente por 10 minutos em um banho ultra-som. Um esquema do diagrama instrumental também foi incluído na Figura 4.3. O primeiro arranjo cromatográfico foi composto de duas bombas Jasco PU-980, uma fornecendo a fase móvel de limpeza a $20 \mu\text{L min}^{-1}$ e outra a fase móvel de separação a $5 \mu\text{L min}^{-1}$. A bomba de limpeza foi conectada a válvula manual de injeção que continha uma alça externa de amostragem de $1 \mu\text{L}$ (se não estabelecido de outra maneira). O sistema de injeção foi conectado a uma válvula seletora de colunas eletronicamente atuada de seis vias (C6WE, Valco) contendo a coluna RAM. A bomba de separação também foi conectada à válvula seletora fornecendo fase móvel para a coluna analítica. A coluna analítica foi diretamente conectada à válvula (sem conector capilar na entrada) e sua saída, um tubo capilar de 15 cm ($50 \mu\text{m i.d.}$), foi ligada no ESI. No segundo arranjo cromatográfico utilizou-se um sistema de cromatografia líquida Agilent série 1100 (Alemanha), basicamente constituído por um micro-amostrador automático G1377A e uma nano-bomba G2226A. A nano-bomba substituiu a bomba Jasco de separação, do sistema anterior, enquanto o micro-amostrador substituiu a válvula manual de injeção (o restante do sistema foi mantido inalterado). Com esses arranjos, tanto em modo *foreflush* (sem inversão de coluna) quanto em *backflush* (com inversão), a válvula seletora foi girada em 3,5 minutos e retornada para a posição inicial em 6,5 minutos.

3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Espectrômetros de massas do tipo quadrupolo simples (API I) e triplo quadrupolo (API III plus), ambos da PE-Sciex (Concord, ON, Canadá) foram usados em diferentes estágios desse trabalho. O API I foi usado nos primeiros estudos com as colunas RAM e analíticas, bem como para o desenvolvimento do arranjo instrumental e estudos para a avaliação e redução do volume morto. O API III *plus* foi usado para os testes finais, organização do arranjo instrumental final, e acoplamento com o sistema HPLC Agilent. Ambos os equipamentos foram operados no modo de ionização positivo usando a mesma interface de ESI pneumaticamente assistida e posicionada fora de eixo. Para facilitar a integração entre o sistema LC e a interface ESI do espectrômetro de massas, uma luva de teflon (180 μm de *i.d.*) com volume morto zero foi usada para conectar topo a topo a saída da coluna capilar e o conector capilar de entrada do ESI. O potencial do ESI foi ajustado em 3500 V. A pressão do gás de nebulização foi ajustada em 40 psi, para ambos os instrumentos, porém o seu efeito sobre a ionização foi avaliado, como será apresentado na seção de resultados. Durante os experimentos de MRM e varredura do íon filho (*scan*) a densidade do gás de colisão foi mantida em $2,10 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} . O potencial aplicado no orifício e a energia de colisão foram otimizados de acordo com a melhor transição MRM para cada grupo de compostos, como apresentado na seção dos resultados. Os cromatogramas foram adquiridos com um tempo de residência (*dwel time*) de 100 ms, quando o equipamento foi operado no modo monitorização de íon selecionado (SIM) ou MRM. Os íons monitorados, correspondentes às moléculas protonadas, com as respectivas transições foram: DES (267,4 $\rightarrow$ 72,2), NOR (264,4 $\rightarrow$ 91,1), IMI (281,4 $\rightarrow$ 86,1), AMI (278,5 $\rightarrow$ 91,1), CLO (315,4 $\rightarrow$ 86,1), FLU (310,3 $\rightarrow$ 44,1), FLU-d5 (315,4 $\rightarrow$ 44,1), ALB (266,2 $\rightarrow$ 234,1), MEB (296,2 $\rightarrow$ 264,1), SOX (282,2 $\rightarrow$ 241,1) e SON (298,2 $\rightarrow$ 266,1). Para o teste de capacidade de

carregamento (*loading capacity*) da coluna RAM, os íons monitorados por MRM foram deslocados para o segundo mais abundante pico isotópico, para evitar saturação do detector do MS. Para FLU e FLU-d5 monitoraram-se ambos, principal e segundo mais abundante, picos isotópicos, de maneira a discriminar entre os fenômenos de supressão da ionização, saturação do detector e sobrecarga da coluna extratora.

3.8 TESTE DO EFEITO DE MATRIZ

Uma bomba seringa Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA) foi usada para os experimentos de infusão contínua. Para testar o efeito de matriz sobre a ionização dos compostos de interesse, um procedimento de infusão em “T”, usando uma conexão flutuante de baixo volume morto, foi realizado.³⁷ Uma solução contendo todos os fármacos em fase móvel em uma concentração de 25 ng mL⁻¹ foi infundida a 1 µL min⁻¹. O restante do sistema foi operado ordinariamente, com a bomba de separação fornecendo a fase móvel a 5 µL min⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS RAM CAPILARES

A capacidade de exclusão das colunas extratoras preparadas com as fases estacionárias ADS-C18, SPS-C18 e BSA-C18 foi testada por meio da injeção direta de plasma não tratado (sem qualquer coluna analítica adaptada ao sistema). Os perfis de exclusão das colunas ADS e BSA foram comparados com o perfil de uma injeção de plasma usando um capilar de sílica fundida substituindo a coluna RAM. Na Figura 4.4 os perfis de exclusão das colunas ADS e BSA são comparados com uma injeção em fluxo (FIA) de plasma sob as mesmas condições. Os picos

detectados usando essa injeção em fluxo tiveram a mesma intensidade daqueles picos eluídos após a exclusão das proteínas, sugerindo que a concentração das proteínas medida no máximo do pico foi igual para todos os picos. Assim, nenhuma quantidade significativa de proteínas ficou retida nas colunas RAM. Em adição, a cauda dos picos retornou ao nível da linha de base após dois minutos da injeção, demonstrando que a total exclusão das proteínas durou um curto intervalo de tempo após a injeção. A coluna SPS (partículas de 5 μm) não foi capaz de aceitar tais injeções de plasma. Uma única injeção de 1 μL gerou obstrução irreversível da coluna e, conseqüentemente, aumento da pressão. Mesmo invertendo-se a coluna e limpando-a com água, o problema não foi completamente solucionado. As partículas relativamente pequenas da coluna SPS não permitiram injeções adequadas de plasma sob as mesmas condições conseguidas para ADS e BSA; assim, a coluna SPS foi excluída dos demais estudos.

Figura 4.4 Perfil de exclusão das macromoléculas após a injeção de um microlitro de plasma humano. 1- sistema em fluxo, 2- coluna RAM-BSA-C18, 3- coluna ADS.

Colunas extratoras foram primeiramente construídas usando filtro de fibra de vidro como *frit*. Essa abordagem tem sido usada com sucesso no preparo de colunas analíticas e extratoras para amostras limpas;²⁸ entretanto, seu uso em colunas RAM para injeções de plasma resultou na obstrução da entrada da coluna. Colunas com construção similar, descritas por Petersson,³⁸ acoplando SPE e CE também apresentaram os mesmos problemas com o uso de amostras de plasma. Nesse trabalho, mesmo removendo-se todo o material particulado presente na amostra, quer seja por filtração ou centrifugação, os problemas de obstrução ocorreram depois de 5 a 8 injeções de plasma diluído. Como o material de empacotamento usado nas colunas era próprio para matrizes biológicas, assumiu-se que alguma parte da matriz estava sendo retida na *frit* de entrada, causando essa obstrução. Essa hipótese é suportada pela observação feita por Yu et al.,³⁹ os quais demonstraram a adsorção de proteínas sobre a superfície do *frit*. Provavelmente, algum tipo de proteína, como fibrinas, por exemplo, pode ser retida na fibra de vidro e resultar na prematura obstrução da entrada das pré-colunas. Para evitar esse obstáculo, novos *hardwares* sem *frit* (*fritless*) para coluna foram desenvolvidos substituindo-se o filtro de fibra de vidro por um segmento curto de um capilar de sílica fundida, de modo a manter as partículas ADS e XDS de 25 µm no interior da coluna. O detalhe da Figura 4.3 mostra as duas opções de *hardware* avaliadas durante a construção das colunas extratoras. Na coluna *fritless*, as partículas de 25 µm foram eficientemente mantidas dentro da coluna com o pequeno tubo de dimensões adequadas. O curto capilar, justamente posicionado depois do leito empacotado e contiguamente contactado pelo, mais espesso, tubo capilar de conexão, foi capaz de manter as partículas dentro da coluna extratora. Cinco colunas utilizando essa abordagem *fritless* foram usadas por toda a vida útil em modo *backflush*. Cada leito cromatográfico foi inspecionado usando um microscópio e nenhuma indicação de falta de partículas, ou formação de espaço, pôde ser observada. As colunas extratoras de segunda geração (*fritless*) foram capazes de suportar até 60 injeções de amostras

de plasma, somadas a incontáveis injeções de soluções aquosas e urina. Colunas preparadas empregando-se os dois tipos de *hardware* (primeira e segunda geração) foram comparadas considerando suas eficiências de extração e ambas resultaram no mesmo perfil extrator.

As colunas BSA e ADS foram comparadas em diferentes aspectos, observando-se a melhor opção para o desenvolvimento do sistema RAM-LC-MS/MS capilar. Primeiramente, a queda de pressão através da coluna foi considerada. Como as partículas usadas na coluna BSA tinham tamanho de 10 μm , um maior diâmetro interno (320 μm) da coluna resultou aproximadamente na mesma perda de carga (queda de pressão) que as colunas ADS de menor diâmetro interno (200 μm) e partículas maiores apresentaram (25 μm). Uma redução no diâmetro interno da coluna BSA resultaria em um inconveniente aumento da perda de carga através da coluna. Comparando ambas as colunas, sob as mesmas condições, recuperações similares foram obtidas. Considerando a desempenho das colunas, a utilização prolongada da coluna BSA resultou em vazamento causado pelo enfraquecimento da colagem feita com a resina epóxi. Por outro lado, nenhuma das colunas ADS testadas demonstrou tal fragilidade. Esse problema, observado com a coluna BSA, foi relacionado com o espaço relativamente maior entre o capilar conector de 200 μm de *o.d.* e o tubo da coluna de 320 μm de *i.d.* Outra desvantagem observada com a coluna BSA foi seu maior volume morto, apesar dele não contribuir para nenhum alargamento significativo da banda cromatográfica, um maior distúrbio da linha de base foi observado no MS. Como uma fase móvel predominantemente aquosa é usada na etapa de limpeza, esse *plug* de solvente contido no interior da coluna alcança o detector após a rotação da válvula seletora. Assim, *plugs* maiores resultaram em um distúrbio mais intenso da linha de base. Além do mais, partículas com 10 μm não poderiam ser usadas na abordagem *fritless* desenvolvida. Uma última consideração é o fato da abordagem RAM-BSA-C18 implicar na derivatização *in situ* da fase estacionária, sendo uma

etapa adicional em comparação ao simples empacotamento das pré-colunas com partículas ADS ou XDS.

A resina epóxi empregada na construção do *hardware* das colunas foi testada como fonte de interferentes para a análise. Um pedaço de resina foi adicionado a um frasco contendo fase móvel (70% ACN) e sonicado por 30 minutos. O sobrenadante foi injetado no MS no modo *scan* e os picos mais intensos do espectro de MS entre 50 e 1000 m/z foram identificados. Depois disso, uma nova coluna foi condicionada usando uma fase móvel com a mesma composição e seu efluente foi conectado ao ESI-MS. Os cinco mais intensos picos de MS dos interferentes da resina epóxi (m/z 191,0; 359,5; 422,0; 512,0; e 540,0) (ver Figura 4.5) foram monitorados em modo SIM. No início, a linha de base apresentou a presença de todos os picos; mas, após 5 minutos, seus sinais começaram a decrescer e nenhum sinal remanescente pode ser observado após 30 minutos de corrida. Os mesmos picos de MS foram monitorados durante o uso normal das colunas em modo *backflush* e nenhum interferente foi observado.

Figura 4.5 Espectro de massas dos interferentes encontrados após extração de um pedaço de resina epóxi.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA ABORDAGEM DE *COLUMN SWITCHING*

Colunas analíticas foram preparadas e suas eficiências cromatográficas avaliadas com base na medida da altura reduzida do prato (h) em modo unidimensional. Todas as fases estacionárias testadas nas colunas analíticas apresentaram eficiência semelhante. As Figuras 4.6 e 4.7 representam cromatogramas obtidos usando-se as quatro fases estacionárias descritas na parte experimental, para ADs e AHs, respectivamente. As fases YMC-AQ e Reprosil-Pur, por serem apropriadas à análise de compostos mais polares, apresentaram maior retenção dos compostos e maior seletividade. Assim, essas colunas foram utilizadas no restante do trabalho. Nas Figuras 4.8 e 4.9 avaliou-se o efeito da fase móvel sobre a separação e resposta do MS, usando-se a coluna YMC-AQ. Para os ADs, uma redução na concentração da solução tampão usada, bem como uma quantidade de ACN em torno de 50% permitiu melhor resposta do ESI-MS. Contudo, o perfil cromatográfico ficou um pouco prejudicado. Dessa forma optou-se por trabalhar com os ADs sob as condições representadas no cromatograma A da Figura 4.8.

Figura 4.6 Comparação do perfil de separação dos ADs usando-se diferentes fases estacionárias.

Para os AHs, não há grande influência sobre a resposta do ESI-MS, contudo o perfil da separação cromatográfica é afetado. Optou-se pela condição A, pois apesar da separação não ser tão grande quanto em outras condições, ela já é suficiente e é conseguida em menor tempo de corrida. Os perfis ilustrados nas condições A e B para ambos os grupos de compostos, ADs e AHs, são similares; contudo optou-se pela condição A, pois nessa a capacidade tamponante é um pouco maior, sem afetar significativamente a eficiência do ESI-MS.

Figura 4.7 Comparação do perfil de separação dos AHs usando-se diferentes fases estacionárias

Figura 4.8 Influência da fase móvel sobre a resposta do ESI-MS e separação cromatográfica.

Figura 4.9 Influência da fase móvel sobre a resposta do ESI-MS e separação cromatográfica.

Valores de h tão baixos quanto 2,5 foram obtidos para os compostos mais retidos. Algum efeito extracolumna parcialmente afetou a eficiência de tais colunas, contudo elas ainda mostraram uma eficiência adequada. Entretanto, a habilidade do sistema de *column switching* em manter e melhorar a eficiência cromatográfica do sistema foi considerada crítica e, assim, avaliada.

Como pode ser observado na Figura 4.10, comparando-se o traço 1 (injeção em fluxo de 60 nL, indicando a dispersão da banda cromatográfica nas linhas de conexão entre o injetor e o sistema de detecção) com os traços 2-4 (diferentes volumes de injeção na coluna RAM) demonstra-se a habilidade da coluna RAM em eficientemente focalizar os analitos. Para comparação, uma injeção de 60 nL (traço 5) em modo unidimensional sem focalização no topo da coluna, bem como uma injeção em fluxo de 500 nL (traço 6) demonstrando o impacto da injeção de grandes volumes sobre a largura do pico, em casos de inapropriada focalização, também foram exemplificados na Figura 4.10. Todas as injeções no modo de *column switching* demonstraram o mesmo perfil, provando a eficiente focalização de pelo menos até 3,8 μ L de volume injetado (maior volume testado). Além do mais, a largura dos picos obtida

com a abordagem de *column switching* foi aproximadamente a metade daquela obtida com a injeção de 60 nL em abordagem unidimensional.

O sistema de *column switching*, construído para esse trabalho, pode ser operado em dois modos, *backflush* e *foreflush*. No modo *backflush* um melhor perfil para os picos pode ser esperado, pois os analitos são focalizados no topo da pré-coluna e então diretamente eluídos para a coluna analítica. Isso evita a necessidade do analito atravessar toda a pré-coluna, que apresenta baixa eficiência. Por outro lado, no modo *foreflush* a pré-coluna providencia uma melhor proteção para a coluna analítica, atuando como uma espécie de filtro de linha. Nesse estudo, uma drástica perda de eficiência foi observada, de maneira geral, para o modo *foreflush*, como pode ser observado na Figura 4.11 (painel a e c em comparação ao painel b e d). Os compostos foram agrupados de acordo com suas características farmacêuticas, sendo possível observar que o grupo de caráter mais básico (painel c), formado pelos antidepressivos, foi mais afetado pelo modo *foreflush*. Essa observação sugere que sítios ativos ainda estão presentes na coluna RAM ou linhas de transferência.

Figura 4.10 Avaliação da focalização dos picos usando *column switching* e cromatografia unidimensional. Traço 1: injeção em fluxo (60 nL); traço 2: *column switching* (500 nL); traço 3: *column switching* (1,9 μ L); traço 4: *column switching* (3,8 μ L); traço 5: unidimensional (60 nL); e traço 6: injeção em fluxo (500 nL).

Os anti-helmínticos não foram tão severamente afetados considerando a largura do pico; entretanto, os dois produtos de biotransformação (picos 1 e 2 no painel a) foram quase que completamente perdidos. Em ambos os modos (painel a e b) o mesmo procedimento de extração/limpeza foi seguido, indicando que a perda dos dois menos retidos compostos ocorreu depois da virada da válvula. A supressão da ionização no ESI é uma forma de explicar a redução na resposta de tais compostos. Uma vez que eles são pouco retidos, eles podem ser deslocados através da coluna extratora durante o procedimento de limpeza e ser eluídos próximo do volume morto (correspondendo a um *plug* constituído basicamente de água e contendo possíveis interferentes). Os demais estudos nesse trabalho foram realizados em modo *backflush* para obter o máximo de eficiência do sistema.

Figura 4.11 Influência do modo de *column switching* (*backflush* x *foreflush*) sobre a simetria do pico e eficiência. Painel (A) AHs em modo *foreflush*; (B) AHs em modo *backflush* (para os AHs, os picos 1-4 são SOX, SON, MEB, e ALB, respectivamente); (C) ADs em modo *foreflush*; e (D) ADs em modo *backflush* (para os ADs, os picos 1-6 são DES, FLU, NOR, IMI, AMI, e CLO, respectivamente).

4.3 EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E FILTRAÇÃO

Herrera,⁴⁰ Arvidson⁴¹ e Eklund⁴² relataram que a temperatura pode influenciar a quantidade de fármacos ligada às proteínas plasmáticas. Adicionalmente, essa taxa de ligação dependente da temperatura pode ser influenciada por ela em ambas as direções, dependendo da característica do fármaco. Hermansson⁴³ discutiu sobre o deslocamento do equilíbrio de ligação do complexo fármaco-proteína durante a eluição e conseqüente extração através da coluna RAM. De acordo com aquele trabalho, uma coluna RAM suficientemente longa é capaz de extrair satisfatoriamente fármacos altamente ligados às proteínas, desde que o fármaco tenha afinidade também pela fase estacionária da coluna. Pautado por essa afirmação, para investigar a real capacidade da coluna RAM utilizada em extrair os fármacos de interesse, a influência da temperatura de incubação foi estudada. Mesmo que a temperatura de incubação altere a quantidade de fármaco ligada às proteínas não se espera que esse efeito seja refletido na quantidade de fármaco recuperada, uma vez que a coluna RAM deve ser capaz de realizar a extração. Outro ponto a ser considerado sobre a quantidade de fármaco a ser recuperada é a influência da filtração, como etapa de pré-tratamento. A filtração pode ser considerada como uma das formas de eliminar o material particulado presente no plasma, podendo influenciar na quantidade extraída se, por exemplo, reter o complexo fármaco-proteína. Um estudo baseado em ANOVA foi realizado para definir a influência dos parâmetros discutidos acima, sobre a capacidade de extração da coluna RAM. Assim, a temperatura de incubação (ambiente – 20 °C ou fisiológica – 37 °C), e a influência da forma de eliminação do material particulado do plasma (centrifugação ou filtração) foram avaliados. Para proporcionar uma melhor compreensão do efeito da matriz sobre esse estudo, os parâmetros discutidos acima foram testados em água e plasma. O nível de significância da ANOVA foi adotado como 0,050 e os resultados demonstraram que o tipo de matriz e o tipo

de técnica de eliminação do material particulado têm efeitos significativos, enquanto a temperatura de incubação não afeta a quantidade de fármaco recuperada. A interpretação desses resultados mostrou interessantes revelações. Uma menor resposta após a filtração poderia ser esperada, caso o complexo fármaco-proteína ficasse retido na membrana de filtração. Além disso, uma vez que a recuperação relativa da maioria dos compostos foi alta, não seria esperado um efeito de matriz significativo nesse estudo. Surpreendentemente, avaliando os resultados da filtração, isoladamente, a presença da matriz plasma levou a recuperação maior do que os testes realizados com água. Esse resultado explica o significativo efeito de matriz observado no teste de ANOVA, onde o plasma foi associado com o efeito positivo. Além disso, a perda dos analitos filtrado em água foi proporcional a hidrofobicidade de cada composto. A resposta dos dois compostos menos retidos não foi afetada pela filtração, enquanto a resposta dos outros compostos foi gradativamente diminuindo em analogia com o aumento da retenção desses compostos na coluna de fase reversa. Esses resultados demonstram a ocorrência de alguma retenção hidrofóbica indesejada dos analitos no dispositivo de filtração. Apesar da filtração do plasma resultar em maiores respostas, em comparação à filtração de água, aquelas respostas foram ainda inferiores às obtidas usando a centrifugação (a qual não foi dependente do efeito de matriz). Adicionalmente, alguns interferentes foram introduzidos pela etapa de filtração, sendo detectados em modo SIM. Dois interferentes (m/z 264,3 e 267,4) tiveram picos cromatográficos com intensidade maior do que 10 vezes aquela dos picos dos compostos de interesse. Todos os interferentes apresentaram tempo de retenção maior que o tempo dos fármacos, demonstrando assim maior hidrofobicidade. A opção de centrifugação mostrou-se suficiente para a remoção das partículas suspensas no plasma e resultou em amostras livres de interferentes. Além disso, essa abordagem permitiu maiores recuperações dos analitos, sendo assim escolhida como a melhor opção para eliminação do material suspenso no plasma. A temperatura de incubação

não afetou a extração da coluna RAM, o que é corroborado pela alta recuperação relativa apresentada pela maioria dos analitos, quando comparando extrações de plasma e água contendo os analitos. Assim, não foi possível obter informação sobre como a temperatura atuou sobre a ligação fármaco-proteína. Contudo, podemos afirmar que variações na quantidade de fármaco ligado não afetam a capacidade extratora da coluna RAM, nas condições avaliadas e para os compostos estudados.

4.4 CAPACIDADE DE CARREGAMENTO (*LOADING CAPACITY*) DA COLUNA CAPILAR ADS

A capacidade de saturação de uma coluna ADS com 1 cm de comprimento foi avaliada. Onze diferentes compostos (10 padrões e 1 padrão deuterado) foram injetados ao mesmo tempo, e em concentrações crescentes. O efeito de saturação devido à sobrecarga do detector do espectrômetro foi minimizado pela monitorização do segundo pico isotópico mais intenso de cada composto. Para FLU e FLU-d5, ambos (monoisotópico e segundo pico isotópico mais intenso) foram avaliados para discriminar a saturação devida à coluna e à sobrecarga do detector do MS. A Figura 4.12A mostra o perfil de carregamento da coluna, contendo as respostas normalizadas dos onze compostos. Como pode ser observado, uma tendência linear é encontrada até 500 pg de massa carregada por composto, antes de algum efeito de saturação começar a agir. Extrapolando-se a linha de tendência para interceptar o nível de saturação, um valor de aproximadamente 1,6 ng por composto pôde ser calculado. Assumindo-se a densidade de empacotamento como 0,7, o conteúdo da coluna situa-se em torno de 220 µg de material de empacotamento. Assim, o limite linear de carregamento foi de aproximadamente 25 µg g⁻¹ de material de empacotamento e a quantidade máxima calculada foi de 80 µg g⁻¹, correspondendo a 87 e 278 nmol g⁻¹, respectivamente. Esses valores estão

relacionados com um limite linear superior de concentração igual a 500 ng mL^{-1} para cada composto, utilizando-se injeções de $1 \text{ }\mu\text{L}$. No método desenvolvido, as amostras de plasma foram diluídas com água na proporção (1:2); dessa forma a coluna estudada poderia ser carregada com concentrações de até $1,5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, sob as condições estudadas, sem ultrapassar o limite linear. Na Figura 4.12B observa-se que a eventual saturação do detector do MS não afetou a medição da capacidade de carregamento da coluna ADS. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as duas curvas (referentes ao pico monoisotópico e ao segundo mais intenso), em um nível estatístico de significância de 0,050. No método otimizado, buscaram-se os menores limites de detecção, para isso o espectrômetro de massas foi ajustado para atingir as concentrações mais baixas. Nestas condições, para os compostos estudados, a linearidade intrínseca do MS (devida ao detector) não foi superior as concentrações de 500 ng mL^{-1} . Assim, o fator limitante para a concentração superior do intervalo linear foi a saturação do MS e não a da capacidade extrativa da coluna ADS.

Figura 4.12 Avaliação da capacidade de carregamento (*loading capacity*) da coluna RAM (1 cm de comprimento). Painel (A) Gráfico normalizado da tendência linear e máximo de carregamento proveniente da injeção simultânea de 11 fármacos; (B) Gráfico da comparação entre as curvas de saturação dos dois mais intensos picos isotópicos da FLU.

4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FRAGMENTAÇÃO POR MS/MS

O potencial aplicado no orifício de entrada pode favorecer a fragmentação da molécula protonada, antes de ser selecionada pelo primeiro quadrupolo. Já a energia fornecida para os íons ao serem transmitidos pela câmara de colisão é o principal parâmetro que afeta a fragmentação nesse estágio. Assim, o ajuste adequado desses valores é necessário para maximizar a resposta para todas as transições MRM monitoradas.

Em equipamentos mais modernos, o ajuste dos potenciais aplicados no caminho dos íons pode ser alternado rapidamente, permitindo que uma condição de fragmentação ideal seja mantida durante o *dwell* de cada transição MRM. No equipamento utilizado nessa parte do trabalho, as condições de potencial não tem como ser ajustadas para cada transição. Assim, um planejamento fatorial foi realizado para encontrar a melhor condição de fragmentação para cada conjunto de compostos de interesse (ADs e AHs).

As Figuras 4.13 e 4.14 apresentam as tendências da influência da voltagem aplicada no orifício de entrada do MS e da energia de colisão, sobre os dois conjuntos de compostos estudados. A linha verde pontilhada indica a condição otimizada para maximizar a resposta da transição MRM dos compostos de interesse (excluindo-se o padrão interno). Não se considerou o padrão interno na otimização, pelo fato desse ser sempre adicionado a amostra em concentração constante e intermediária em relação aos compostos alvo, para os quais se busca a máxima detectabilidade. Os resultados obtidos foram modelados por superfície de respostas. Os valores ótimos calculados pelo algoritmo simplex, utilizando o *software* Statistica 6.0[®]; ou pelo algoritmo solver, utilizando o *software* Excel 2002[®], foram concordantes.

Figura 4.13 Condições de fragmentação ajustadas para os ADs.

Figura 4.14 Condições de fragmentação ajustadas para os AHs.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NEBULIZAÇÃO NA IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*

A ionização a baixas vazões pode ser obtida no modo ESI puro, ou utilizando gás de nebulização no modo *ion spray*. Geralmente as interfaces de ESI-MS apropriadas conseguem operar em modo ESI puro até vazões de $15 \mu\text{L min}^{-1}$,⁴⁴ mas muitas vezes esse modo é reservado apenas para aplicações de nano-LC, usando interfaces nano-ESI. Nas Figuras 4.15 e 4.16 avaliou-se o efeito da nebulização sobre o desempenho da interface ESI-MS. A intensidade da resposta foi aleatória para os ADs, e para os AHs intensidades um pouco maiores foram atingidas com o ESI puro. Contudo, a estabilidade da corrente elétrica, e assim a estabilidade do *spray* formado foi melhor no modo com assistência pneumática, permitindo

menor ruído da linha de base. Dessa forma, optou-se por trabalhar no modo ESI com assistência pneumática (ou seja, *ion spray*).

Figura 4.15 Efeito da nebulização sobre a resposta do ESI-MS para os ADs. A Série A representa o modo *ion spray* com gás de nebulização a 40 psi. A Série B representa o modo ESI puro (sem gás de nebulização).

Figura 4.16 Efeito da nebulização sobre a resposta do ESI-MS para os AHs. A Série A representa o modo *ion spray* com gás de nebulização a 40 psi. A Série B representa o modo ESI puro (sem gás de nebulização).

4.7 EFEITO DE MATRIZ SOBRE A ESI E SOBRE A EXTRAÇÃO COM RAM

O efeito de matriz na abordagem RAM-LC-ESI-MS/MS poderia atuar sobre dois pontos: na ionização por ESI, causando supressão, e na extração com a coluna RAM, causando a perda parcial dos analitos.

A Figura 4.17 mostra um resumo dos resultados obtidos com o teste de supressão da ionização. Como o sistema de *column switching* direciona um *plug* predominantemente aquoso para o ESI, uma supressão inicial da linha de base, mostrada na Figura 4.17, deve ser esperada como normal por um curto intervalo de tempo depois da atuação da válvula. Foi feita uma comparação usando-se o cromatograma de íons totais (TIC), injeções de água (traço 2), plasma (traço 3) e urina (traço 4) não evidenciaram diferenças importantes depois do tempo necessário para o efeito da eluição do *plug* aquoso deixar o sistema. Também é apresentada na Figura 4.17, traço 5, a transição de MRM para o primeiro pico cromatográfico eluído em cada grupo de fármacos, onde se observa que mesmo os primeiros picos são eluídos logo após o distúrbio da linha de base causado pelo *plug* aquoso.

Figura 4.17 Avaliação do efeito de matriz sobre a ionização por ESI-MS. Painel (A) TIC; (B) MRM da DES, (C) MRM do SOX. Corridas 1-5: sem injeção, injeção de água, injeção de plasma diluído (1:2), injeção de urina diluída (1:2) e injeção de padrão, respectivamente.

A dinâmica da extração realizada pela coluna RAM já foi discutida em outro lugar.⁴³ Ela pode ser resumida como dois equilíbrios co-existent, um entre o fármaco e os sítios de ligação das proteínas, e o outro entre o fármaco e os sítios de retenção da fase estacionária. Entretanto, devido às características do meio de acesso restrito, durante a eluição através da coluna RAM, as concentrações são deslocadas em benefício da extração do fármaco. A coluna RAM é especialmente desenhada para evitar o efeito de matriz causado pelas proteínas e outras macromoléculas hidrofílicas. Contudo, alguma adsorção inespecífica das proteínas pode ocorrer dentro da coluna e pequenas moléculas endógenas podem competir pelos sítios de retenção. O efeito de matriz foi avaliado calculando a recuperação relativa das amostras de fluidos biológicos em respeito aos padrões preparados em água. Para o grupo dos ADs, nenhum efeito de matriz importante foi observado e usualmente as recuperações daqueles compostos estiveram entre 80 e 120%. Para o grupo dos AHs, algum efeito foi observado para os produtos de biotransformação e uma recuperação ligeiramente menor foi relacionada à matriz urina em comparação ao plasma. Isto pode ser explicado pelo fato dos AHs apresentarem uma menor afinidade pela coluna ADS, especialmente os produtos de biotransformação por serem muito polares.

É sabido que a urina tem uma concentração muito menor de proteínas que o plasma; entretanto, pequenos compostos endógenos podem estar presentes, bem como uma alta concentração de sais. Isso pode explicar o fato da matriz urina influenciar em maior escala os analitos com uma menor afinidade pela fase estacionária. A fase móvel de limpeza também pode afetar a eficiência total da extração, mas essa é mais relacionada com a recuperação absoluta dos analitos. Por exemplo, uma alta concentração de modificador orgânico pode implicar na perda dos analitos por eluição durante a lavagem, independentemente da matriz. Uma melhoria média de 38% na eficiência de extração, possivelmente devido ao efeito de pareamento iônico, somada à redução da pressão no sistema foram obtidas usando-se uma

baixa concentração de eletrólitos voláteis (acetato de amônio/amônia 20 mM), pH 7,4, substituindo a água como solvente de lavagem. Normalmente depois de uma injeção de plasma a pressão do sistema apresenta um aumento, caindo após algum tempo. Com o eletrólito, a taxa de aumento da pressão foi menor e a pressão iniciou sua queda mais cedo. A extração também foi afetada pela quantidade de ACN adicionada na fase móvel de limpeza, e esses resultados foram dependentes das características do analito. Para os produtos de biotransformação do ALB, o uso de ACN resultou na redução da recuperação. Entretanto, para a maioria dos compostos testados 10% de ACN não prejudicou a recuperação. Como 10% de ACN poderia gradativamente precipitar as proteínas no interior da coluna, o método para análise de ADs foi otimizado com 5% de ACN e o método para AHs com 0% de ACN devido à perda dos produtos de biotransformação.

A fase RAM XDS também foi avaliada e os cromatogramas comparando as colunas XDS e ADS para os ADs e AHs são resumidos nas Figuras 4.18 e 4.19. Um planejamento experimental comparando o efeito de matriz (água, plasma ou urina), o tipo de fase RAM (XDS ou ADS) e a fase móvel de lavagem (água ou 10% de ACN + 20 mM de eletrólito) foi realizado. Resumidamente, a fase ADS apresentou melhor recuperação, particularmente para os produtos de biotransformação do albendazol, que quase não foram extraídos pela coluna XDS. O efeito adsorptivo, demonstrado por meio de cauda nos picos cromatográficos, é maior para a coluna de troca catiônica (XDS). Além disso, a coluna XDS é mais susceptível ao efeito de matriz, principalmente para a urina e também menos tolerante à quantidade de eletrólito usado na lavagem da pré-coluna, pois esses atuam como competidores catiônicos pelos sítios de retenção.

Figura 4.18 Comparação entre a pré-coluna ADS (A) e XDS (B) para os ADs em plasma. Fase móvel de limpeza: 10% ACN + 20 mM acetato de amônio/amônia, pH 7,4.

Figura 4.19 Comparação entre a pré-coluna ADS (A) e XDS (B) para os AHs em plasma. Fase móvel de limpeza: água.

4.8 APLICABILIDADE DO SISTEMA DESENVOLVIDO E RESULTADOS DAS VALIDAÇÕES

Dois conjuntos de instrumentos foram testados durante o desenvolvimento da abordagem RAM-LC-MS, mantendo-se a mesma válvula de *column switching* e colunas como o cerne do sistema. Apesar de algumas diferenças intrínsecas entre os sistemas cromatográficos (por exemplo, queda de pressão nas linhas do sistema e limite inferior de vazão), o desempenho global das duas montagens foi o mesmo para a análise das mesmas amostras. Nesse trabalho a adequada separação por LC-MS/MS, como mostrado na

Figura 4.20, foi obtida para os dez diferentes fármacos básicos em um tempo de apenas 8 minutos, incluindo a etapa de preparo de amostras.

Os limites de detecção obtidos ficaram entre 0,08 e 1,5 ng mL⁻¹ para os ADs e AHs. Os resultados da validação são detalhados nas Tabelas (1 a 3) e Figuras 4.21 a 4.23. Resumindo, o LQ foi de 1 ng mL⁻¹ para os ADs e ficou entre 2 e 5 ng mL⁻¹ para os AHs. Um ponto a ser considerado é que a quantidade de amostra requerida para atingir tais níveis de detecção foi de apenas 1 µL de fluidos biológicos (diluídos 1:2 com água). Isto significa que tal detectabilidade foi obtida injetando-se efetivamente apenas 333 nL de material biológico, enquanto a maioria dos métodos na literatura correntemente descrevem a necessidade de utilizar entre 100 µL e 1 mL para atingir os mesmos níveis assinalados. A precisão intra-dia e inter-dias foi avaliada como RSD com cinco replicatas em três níveis e em três dias diferentes e mostrou resultados menores que 20% para os LQs e menores que 14,5% para os outros níveis. A exatidão foi avaliada no mesmo esquema do teste anterior e valores dentro de ±20% foram obtidos para os LQs e valores dentro de ±13,1% para os outros níveis. A recuperação já foi discutida em uma seção prévia desse capítulo, e é adequada para os níveis de concentração estudados. A linearidade obtida em plasma ficou entre o LQ e 500 ng mL⁻¹ para os AHs e entre o 1 e 250 ng mL⁻¹ para os ADs com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,996 para todos os compostos. Para os ADs foi investigada brevemente a linearidade em urina e para alguns compostos ela ficou limitada a 100 ng mL⁻¹. Esse fato deve ser atribuído à competição de compostos endógenos presentes na urina, uma vez que com plasma a linearidade foi até 250 ng mL⁻¹ para todos os compostos. Para obtenção de ajustes lineares adequados foi utilizada uma curva de calibração ponderada com valores de 1/x. Como o intervalo linear é amplo, uma vez que os limites inferiores são baixos, um ajuste não ponderado consideraria demasiadamente os pontos mais altos nos cálculos de regressão. Dessa forma, apesar de valores de coeficientes de correlação ainda melhores que os obtidos

com ajuste ponderado, maiores somatórias de resíduos seriam obtidos, indicando uma pior qualidade do ajuste à tendência linear. Os baixos limites de quantificação obtidos nesse trabalho, e os intervalos de linearidade, são adequados para estudos de TDM e de farmacocinética e/ou bioequivalência (PK/BE).⁴⁵⁻⁴⁹ Os níveis mais baixos requeridos para estudos de PK/BE, para os compostos estudados, são de aproximadamente 1 ng mL^{-1} para FLU⁵⁰ e ALB⁴⁸, e maiores para outros compostos.⁵¹ Para aplicações de TDM, os limites requeridos são mais altos e muitos métodos da literatura, atingindo valores de LQ ao redor de 10 ng mL^{-1} , são relatados.⁵²⁻⁵⁶ Além disso, esse trabalho resultou de um MS/MS com 15 anos de uso e detectando massas a um nível de aproximadamente 0,1 pg (entre poucos fmoles e centenas de attomoles). Com um instrumento de nova geração ainda poder-se-ia esperar 10 a 100 vezes melhor resposta do MS.

Figura 4.20 Cromatograma representativo da separação e detecção em modo MRM dos dez fármacos e produtos de biotransformação estudados neste trabalho, dentro de uma janela de eluição de apenas 2,5 minutos. Os picos são: (1) SOX, (2) SON, (3) MEB, (4) DES, (5) FLU, (6) ALB, (7) NOR, (8) IMI, (9) AMI e (10) clomipramina.

Tabela 4.1 Dados de validação para os fármacos antidepressivos em plasma.

Composto	Nível	Coeficiente de correlação (r)	Precisão RSD (%)				Recuperação relativa (%)			Exatidão bias (%)
			Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dias	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
DES	Baixo	0,9990	9,3	4,9	2,2	19,4	82,7	110,2	85,3	6,6
	Médio		3,8	3,2	2,0	6,7	89,3	93,4	94,3	6,8
	Alto		2,3	3,2	7,6	5,0	101,7	91,1	98,2	-3,4
NOR	Baixo	0,9985	12,9	8,2	9,4	15,0	81,9	110,4	96,2	-11,8
	Médio		7,0	3,1	4,0	5,2	90,8	86,7	97,9	-7,3
	Alto		6,4	6,7	9,2	7,5	99,3	87,3	102,1	-11,1
IMI	Baixo	0,9955	5,4	10,3	7,4	10,0	81,3	116,5	97,8	-18,5
	Médio		10,0	1,0	5,4	6,1	83,1	111,1	114,4	13,1
	Alto		6,7	5,9	5,1	5,5	103,7	95,8	104,9	-5,9
AMI	Baixo	0,9985	8,2	8,6	2,3	7,4	85,8	119,3	96,6	-7,3
	Médio		6,8	1,8	5,3	12,0	91,7	119,9	124,3	-6,1
	Alto		6,3	6,3	8,7	12,6	103,4	95,5	109,7	-14,7
FLU	Baixo	0,9994	3,9	4,5	7,9	14,4	94,2	116,5	91,7	2,3
	Médio		3,1	1,8	1,8	5,0	91,0	104,0	106,4	8,9
	Alto		1,0	0,4	1,9	2,1	101,8	89,8	99,9	-2,1
FLU-d5	IS	-	-	-	-	-	81,1	103,2	105,1	-

OBS.

Nível baixo = 1ng mL⁻¹ / Nível médio = 40 ng mL⁻¹ / Nível alto = 250 ng mL⁻¹

IS = padrão interno / “-” = informação não existente

Resultados intra-dia obtidos com n = 5 / Resultados inter-dias obtidos com n = 15

Tabela 4.2 Dados de recuperação para os fármacos antidepressivos em urina.

		Recuperação (%)				
		DES	NOR	IMI	AMI	FLU
Composto	Nível					
	1 ng mL ⁻¹	79,0	83,6	69,3	71,3	79,7
	2 ng mL ⁻¹	76,9	85,2	72,2	74,8	81,7
	40 ng mL ⁻¹	75,6	74,7	77,4	81,2	85,1
	250 ng mL ⁻¹	93,2	-	-	-	88,5

OBS.

“-” = informação não se aplica.

Tabela 4.3 Dados de validação para o albendazol e seus produtos de biotransformação em plasma.

Composto	Nível	Coeficiente de correlação (r)	Precisão RSD (%)			
			Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dias
SOX	Baixo II	0,9958	17,2	1,9	20,2	18,1
	Médio		8,6	5,8	14,4	14,5
	Alto		5,7	7,8	9,1	14,3
SON	Baixo I	0,9976	5,3	5,7	12,7	10,7
	Baixo II		12,7	6,2	8,3	14,2
	Médio		13,0	8,7	8,6	10,5
	Alto		2,7	10,5	3,9	8,2
ALB	Baixo I	0,9979	12,6	9,9	8,9	17,7
	Baixo II		13,7	9,9	8,9	17,0
	Médio		2,7	11,8	5,7	8,0
	Alto		3,5	4,2	1,9	4,0

OBS.

Nível baixo I = 2 ng mL⁻¹ / Nível baixo II = 5 ng mL⁻¹ / Nível médio = 100 ng mL⁻¹ / Nível alto = 500 ng mL⁻¹
 Resultados intra-dia obtidos com n = 5 / Resultados inter-dias obtidos com n = 15

Tabela 4.4 Recuperações relativas e exatidões obtidas para o albendazol e seus produtos de biotransformação.

Composto	Nível	Recuperação Relativa (%)		Exatidão bias (%)
		Plasma	Urina	Plasma
SOX	Baixo	25,2	41,2	-9,3
	Médio	27,7	27,2	7,8
	Alto	55,4	50,8	-0,9
SON	Baixo	44,9	37,6	20,1
	Médio	39,9	30,0	6,9
	Alto	53,4	45,6	8,3
ALB	Baixo	74,6	62,9	5,9
	Médio	119,6	78,3	6,9
	Alto	98,2	70,2	-1,7
MEB	IS	86,4	60,2	-

OBS.

Nível baixo = 15 ng mL⁻¹ / Nível médio = 125 ng mL⁻¹ / Nível alto = 425 ng mL⁻¹

IS = padrão interno / “-” = informação não existente

Resultados de exatidão obtidos com n = 5

Figura 4.21 Curvas analíticas para os AHs em plasma. Retas de regressão ajustada para os resultados ponderados ($1/x$), utilizando MEB como padrão interno. (A) SOX, (B) SON e (C) ALB.

Figura 4.22 Curvas analíticas para os ADs em plasma. Retas de regressão ajustada para os resultados ponderados ($1/x$), utilizando FLU-d5 como padrão interno. (A) DES, (B) NOR, (C) IMI, (D) AMI e (E) FLU.

Figura 4.23 Curvas analíticas para os ADs em urina. Reta de regressão ajustada para os resultados ponderados (1/x), utilizando FLU-d5 como padrão interno. (A) DES, (B) NOR, (C) IMI, (D) AMI e (E) FLU.

Um efeito de memória (*carryover*) foi observado em um nível de aproximadamente 0,3% de uma amostra previamente injetada e este pode ser associado com a baixa inércia da válvula usada no estudo. O uso de uma válvula quimicamente inerte e mesmo alguma etapa adicional de lavagem implementada por outras bombas e/ou injetores automáticos podem melhorar esse aspecto, se necessário.⁵⁷ Recentemente, Bakhtiar⁵⁸ revisou os problemas relacionados à quantificação de pequenos fármacos em fluidos biológicos e indicou algumas estratégias para resolver os problemas com efeito de memória.

A abordagem desenvolvida nesse trabalho oferece uma boa possibilidade para o campo das análises de biomoléculas em fluidos biológicos, juntando as vantagens da

miniaturização em LC e MS. Em contraste com a tecnologia de miniaturização em *chips* que é uma atraente possibilidade para o futuro, a tecnologia de LC capilar e nano-LC já provaram sua confiabilidade no atual estado em que se encontram desenvolvidas.

5 CONCLUSÃO

Uma nova abordagem acoplando RAM-LC-ESI-MS/MS em escala totalmente capilar foi desenvolvida para a análise simultânea e *online* de fármacos em pequenos volumes de amostras biológicas não tratadas (apenas diluídas 1:2 e centrifugadas). As pré-colunas capilares desenvolvidas usando partículas RAM-ADS mostraram adequada exclusão das proteínas e eliminaram completamente o efeito de matriz sobre a ionização por ESI. O *hardware* para colunas desenvolvido sem a utilização de *frits* permitiu a injeção de amostras biológicas não tratadas e foi capaz de suportar pressões de pelo menos 400 bar, sem vazamento. O uso de eletrólito volátil em pH fisiológico apresentou melhor resultado que o uso de água pura durante a etapa de limpeza. A ACN, em baixas proporções, também beneficiou a eficiência da fase móvel na limpeza da coluna, além de mostrar atuação composto-dependente. A capacidade de carregamento da pré-coluna foi avaliada pela extração simultânea de diferentes compostos e mostrou um amplo intervalo linear dinâmico; assim, o parâmetro limitante no intervalo dinâmico de detecção é a amplitude de resposta linear oferecida pelo sistema de detecção do MS. A abordagem desenvolvida foi usada para a separação e detecção seletiva de dez fármacos e produtos de biotransformação. Os resultados de quantificação atingiram até 1 ng mL⁻¹. É importante ressaltar que o método utilizou apenas 333 nL de amostra para atingir o nível de poucos nanogramas por mililitro, enquanto métodos em escala convencional têm consumido entre 100 µL e 1 mL de amostra para atingir os mesmos valores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ISHII, D.; TAKEUCHI, T. Miniaturization in column liquid chromatography. **Trends Anal. Chem.**, v. 9, n. 5, p. 152-157, 1990.
2. SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. State of the art in miniaturized separation techniques. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 2002.
3. VISSERS, J. P. C. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 856, n. 1-2, p. 117-143, 1999.
4. VISSERS, J. P. C.; DE RU, A. H.; URSEM, M.; CHERVET, J.-P. Optimised injection techniques for micro and capillary liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 746, n. 1, p. 1-7, 1996.
5. DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; MURPHY, C. M. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 14, n. 11, p. 1290-1294, 2003.
6. MULLER, C.; SCHAFER, P.; STORTZEL, M.; VOGT, S.; WEINMANN, W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. **J. Chromatogr. B**, v. 773, n. 1, p. 47-52, 2002.
7. KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.
8. BUHRMAN, D. L.; PRICE, P. I.; RUDEWICZ, P. J. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 7, n. 11, p. 1099-1105, 1996.
9. MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. **Anal. Chem.**, v. 70, n. 5, p. 882-889, 1998.

10. TILLER, P. R.; ROMANYSHYN, L. A. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 16, n. 2, p. 92-98, 2002.
11. SMITH, R. M. Before the injection: modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, 2003.
12. MOLDOVEANU, S. C. Solutions and challenges in sample preparation for chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 1-14, 2004.
13. MARCHI, I.; RUDAZ, S.; SELMAN, M.; VEUTHEY, J.-L. Evaluation of the influence of protein precipitation prior to on-line SPE-LC-API/MS procedures using multivariate data analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 845, n. 2, p. 244-252, 2007.
14. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, n. 4, p. 913-920, 2004.
15. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **J. Chromatogr. A**, v. 1058, n. 1-2, p. 61-66, 2004.
16. BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in HPLC: part II – applications. **LC-GC**, v. 15, n. 9, p. 814-823, 1997.
17. BRUINS, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. **J. Chromatogr. A**, v. 794, n. 1-2, p. 345-357, 1998.
18. GELPI, E. Contributions of liquid chromatography-mass spectrometry to highlights of biomedical research. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1-2, p. 567-581, 2003.
19. GOMEZ-HENS, A.; AGUILAR-CABALLOS, M. P. Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery. **Trends Anal. Chem.**, v. 26, n. 3, p. 171-182, 2007.
20. WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Anal. Chem.**, v. 57, n. 3, p. 675-679, 1985.

21. BRUINS, A. P.; COVEY, T. R.; HENION, J. D. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 59, n. 22, p. 2642-2646, 1987.
22. ABIAN, J.; OOSTERKAMP, A. J.; GELPÍ, E. Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations. **J. Mass Spectrom.**, v. 34, n. 4, p. 244-254, 1999.
23. HASKINS, W. E.; WANG, Z.; WATSON, C. J.; ROSTAND, R. R.; WITOWSKI, S. R.; POWELL, D. H.; KENNEDY, R. T. Capillary LC-MS² at the attomole level for monitoring and discovering endogenous peptides in microdialysis samples collected in vivo. **Anal. Chem.**, v. 73, n. 21, p. 5005-5014, 2001.
24. GALE, D. C.; SMITH, R. D. Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 7, n. 11, p. 1017-1021, 1993.
25. SHEN, Y.; TOLIC, N.; MASSELON, C.; PASA-TOLIC, L.; CAMP, D. G.; HIXSON, K. K.; ZHAO, R.; ANDERSON, G. A.; SMITH, R. D. Ultrasensitive proteomics using high-efficiency on-line micro-SPE-nanoLC-nanoESI MS and MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 76, n. 1, p. 144-154, 2004.
26. IVANOV, A. R.; ZANG, L.; KARGER, B. L. Low-attomole electrospray ionization MS and MS/MS analysis of protein tryptic digests using 20 µm-i.d. polystyrene-divinylbenzene monolithic capillary columns. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 20, p. 5306-5316, 2003.
27. LUO, Q.; PAGE, J. S.; TANG, K.; SMITH, R. D. MicroSPE-nanoLC-ESI-MS/MS using 10 µm-i.d. silica-based monolithic columns for proteomics. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 2, p. 540-545, 2007.
28. SWART, R.; KOIVISTO, P.; MARKIDES, K. E. Column switching in capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantitation of pg/ml concentrations of the free basic drug tolterodine and its active 5-hydroxymethyl metabolite in microliter volumes of plasma. **J. Chromatogr. A**, v. 828, n. 1-2, p. 209-218, 1998.
29. CAI, J.; HENION, J. Quantitative multi-residue determination of beta-agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction coupled column packed capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 691, n. 2, p. 357-370, 1997.
30. SAITO, Y.; JINNO, K. On-line coupling of miniaturized solid-phase extraction and microcolumn liquid-phase separations. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, n. 6, p. 325-331, 2002.

- 31.LIU, S.; GRIFFITHS, W. J.; SJOVALL, J. Capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for analysis of steroid sulfates in biological samples. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 4, p. 791-797, 2003.
- 32.HSIEH, Y.; WANG, G.; WANG, Y.; CHACKALAMANNIL, S.; KORFMACHER, W. A. Direct plasma analysis of drug compounds using monolithic column liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 8, p. 1812-1818, 2003.
- 33.CHRISTIAENS, B.; FILLET, A.; CHIAP, P.; RBEIDA, O.; CECCATO, A.; STREEL, B.; DE GRAEVE, J.; CROMMEN, J.; HUBERT, P. Fully automated method for the liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up. **J. Chromatogr. A**, v. 1056, n. 1-2, p. 105-110, 2004.
- 34.LANCKMANS, K.; VAN EECKHAUT, A.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Capillary and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of small molecules in microdialysis samples: comparison with microbore dimensions. **J. Chromatogr. A**, v. 1131, n. 1-2, p. 166-175, 2006.
- 35.SUENAMI, K.; LIM, L. W.; TAKEUCHI, T.; SASAJIMA, Y.; SATO, K.; TAKEKOSHI, Y.; KANNO, S. On-line sample extraction and enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs by pre-column in capillary liquid chromatography mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 846, n. 1-2, p. 176-183, 2007.
- 36.SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C.; LANCAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **J. Chromatogr. A**, v. 1105, n. 1-2, p. 71-76, 2006.
- 37.BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 13, n. 12, p. 1175-1185, 1999.
- 38.PETERSSON, M.; WAHLUND, K.-G.; NILSSON, S. Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 841, p. 249-261, 1999.
- 39.YU, Z. X.; WESTERLUND, D.; BOOS, K. S. Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems. **J. Chromatogr. B**, v. 704, n. 1-2, p. 53-62, 1997.

40. HERRERA, A. M.; SCOTT, D. O.; LUNTE, C. E. Microdialysis sampling for determination of plasma-protein binding of drugs. **Pharm. Res.**, v. 7, n. 10, p. 1077-1081, 1990.
41. ARVIDSSON, T.; EKLUND, E. Determination of free concentration of ropivacaine and bupivacaine in blood-plasma by ultrafiltration and coupled-column liquid-chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 668, n. 1, p. 91-98, 1995.
42. EKLUND, E.; NORSTEN-HOOG, C.; ARVIDSSON, T. Determination of free concentration of sameridine in blood plasma by ultrafiltration and coupled-column liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 708, n. 1-2, p. 195-200, 1998.
43. HERMANSSON, J.; GRAHN, A.; HERMANSSON, I. Direct injection of large volumes of plasma/serum on a new biocompatible extraction column for the determination of atenolol, propranolol and ibuprofen: mechanisms for the improvement of chromatographic performance. **J. Chromatogr. A**, v. 797, n. 1-2, p. 251-263, 1998.
44. IKONOMOU, M. G.; BLADES, A. T.; KEBARLE, P. Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance. **Anal. Chem.**, v. 63, n. 18, p. 1989-1998, 1991.
45. PRESKORN, S. H.; DOREY, R. C.; JERKOVICH, G. S. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. **Clin. Chem.**, v. 34, n. 5, p. 822-828, 1988.
46. IVANDINI, T. A.; SARADA, B. V.; TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; TRYK, D. A.; ISHIGURO, H.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, v. 521, n. 1-2, p. 117-126, 2002.
47. RAGGI, M.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; VOLTERRA, V.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Improved HPLC determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. **Chromatographia**, v. 50, n. 7, p. 423-427, 1999.
48. CHEN, X.; ZHAO, L.; XU, H.; ZHONG, D. Simultaneous determination of albendazole and its major active metabolite in human plasma using a sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, n. 4, p. 829-836, 2004.
49. BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, O. M. Simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 783, n. 1, p. 237-245, 2003.

- 50.VLASE, L.; IMRE, S.; LEUCUTA, S. Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 66, n. 3, p. 659-663, 2005.
- 51.YOSHIDA, H.; HIDAKA, K.; ISHIDA, J.; YOSHIKUNI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Highly selective and sensitive determination of tricyclic antidepressants in human plasma using high-performance liquid chromatography with post-column tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(III) chemiluminescence detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 413, n. 1-2, p. 137-145, 2000.
- 52.RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, n. 1-2, p. 193-199, 1998.
- 53.FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. **J. Chromatogr. B**, v. 794, n. 1, p. 35-47, 2003.
- 54.KOLLROSER, M.; SCHÖBER, C. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with an ion trap detector. **Ther. Drug Monit.**, v. 24, n. 4, p. 537-544, 2002.
- 55.AYMARD, G.; LIVI, P.; PHAM, Y. T.; DIQUET, B. Sensitive and rapid method for the simultaneous quantification of five antidepressants with their respective metabolites in plasma using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **J. Chromatogr. B**, v. 700, n. 1-2, p. 183-189, 1997.
- 56.DUVERNEUIL, C.; DE LA GRANDMAISON, G. L.; DE MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J. C. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs. **Ther. Drug Monit.**, v. 25, n. 5, p. 565-573, 2003.
- 57.ASAKAWA, Y.; OZAWA, C.; OSADA, K.; KANEKO, S.; ASAKAWA, N. Reduction of carry-over in column-switching HPLC/MS system with automated system washing procedure for highly sensitive direct analysis of donepezil in dog plasma. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, n. 2, p. 683-690, 2007.
- 58.BAKHTIAR, R.; MAJUMDAR, T. K. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 55, n. 3, p. 262-278, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

“Great spirits have often encountered violent opposition from weak minds.”

Albert Einstein

CONCLUSÃO GERAL

A integração do preparo de amostras com a etapa analítica, por meio da utilização de cromatografia multidimensional em *column switching* com colunas RAM mostrou-se adequada e atrativa para todas as escalas cromatográficas avaliadas. Cada uma das escalas tem suas peculiaridades, vantagens e limitações, as quais foram apresentadas e discutidas nos capítulos anteriores.

A escala convencional já foi amplamente estudada e diversas aplicações podem ser encontradas na literatura. Nesse trabalho a análise de um fármaco com características básicas (FLU) foi validada utilizando a escala convencional. Nessa escala, o uso de *column switching* mostrou-se robusto e facilmente aplicável às condições encontradas na maioria dos laboratórios que trabalham com cromatografia líquida. Pequenas modificações, basicamente a utilização de uma válvula seletora acoplada a duas bombas cromatográficas, já são capazes de transformar um sistema convencional em um sistema apto para realizar preparo de amostras integrado, com a utilização de colunas RAM. Outra escala que também pode ser facilmente utilizada em modo multidimensional é a *microbore*. A cromatografia com colunas de aproximadamente 2,1 mm de diâmetro interno e vazões em torno de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ tem sido amplamente utilizada no acoplamento com a espectrometria de massas, quando utilizada a interface de ionização atmosférica por ESI. Por exemplo, em aplicações na área farmacêutica, a análise de fármacos por LC-MS dá-se principalmente nessa escala. Em nossos trabalhos mostrou-se que essa escala também gera adequado perfil cromatográfico e os resultados preliminares de um projeto em andamento, para a análise de fármacos anti-helmínticos em plasma bovino, mostraram método com adequada detectabilidade e colunas RAM robustas.

Na escala miniaturizada utilizando *column switching* com colunas RAM o obstáculo que pode causar o fracasso do trabalho é a presença de volume morto em excesso. Uma vez

superada parcialmente ou totalmente a contribuição do volume morto para o alargamento excessivo dos picos cromatográficos, excelentes resultados podem ser obtidos. Na escala capilar, melhoria significativa na detectabilidade dos métodos pode ser obtida com um consumo ínfimo de amostras. Além disso, o acoplamento com a espectrometria de massas utilizando ESI é beneficiado pela menor vazão de fase móvel e melhores resultados são conseguidos, com menor contaminação do espectrômetro de massas. Apesar desse trabalho, utilizando colunas RAM, ser pioneiro na escala capilar, produziu-se evidências suficientes para afirmar que essa seria uma alternativa muito atraente para muitos métodos utilizados atualmente, os quais consomem grande quantidade de amostras e solventes.

De maneira geral, os métodos desenvolvidos permitiram a análise de fármacos em plasma e urina, com a vantagem de reduzir o contato com as amostras biológicas. Em contraste às diversas técnicas de preparo de amostras que requerem sucessivas etapas manuais, a técnica de *column switching* permite a introdução da amostra no sistema analítico após uma simples centrifugação e, algumas vezes, pequena diluição da amostra. O consumo de tempo para uma análise completa pode ser inferior a dez minutos (incluindo a etapa de preparo de amostras), restando ainda alternativas para redução ainda maior do tempo de análise (uso de colunas RAM em paralelo ou cromatografia rápida na segunda dimensão). Em comparação com a LLE e SPE *off-line* convencional, o ganho de tempo para o analista é significativo e a qualidade das análises é compatível, em termos de detectabilidade, e estabilidade, obtendo-se extratos mais limpos em algumas aplicações para LC-MS. Em comparação a técnicas mais recentes, tais como SPME e SBSE, a utilização de RAM-LC pode resultar em análises um pouco mais sensíveis e com reduzido tempo de análise. Essas técnicas (SPME e SBSE) apresentam a vantagem da portabilidade para análises de campo, onde as amostras não podem ser levadas facilmente até o laboratório, porém para o uso em rotina laboratorial são muito mais laboriosas e lentas. Finalmente, o custo para implantação de um sistema de *column*

switching pode ser facilmente recuperado, devido à economia de reagentes, reutilização de colunas extratoras e menor demanda pelo tempo dos analistas.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSA DA FRAGMENTAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS ESTUDADOS E ROTA DE FRAGMENTAÇÃO SUGERIDA.

Espectro de massas e rota de fragmentação para desipramina.

Espectro de massas e rota de fragmentação para nortriptilina.

Espectro de massas e rota de fragmentação para imipramina.

Espectro de massas e rota de fragmentação para amitriptilina.

Espectro de massas e rota de fragmentação para fluoxetina.

Espectro de massas e rota de fragmentação para clomipramina.

APÊNDICE B – ESPECTROS DE MASSA DA FRAGMENTAÇÃO DOS ANTI-HELMÍNTICOS ESTUDADOS E ROTA DE FRAGMENTAÇÃO SUGERIDA.

Espectro de massas e rota de fragmentação para albendazol.

Espectro de massas e rota de fragmentação para sulfóxido de albendazol.

Espectro de massas e rota de fragmentação para albendazol sulfona.

Espectro de massas e rota de fragmentação para mebendazol.

SÚMULA CURRICULAR

1 FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Ciências** (Química Analítica) setembro/2003 – atual
IQSC/USP
- **Mestrado em Ciências** (Química Analítica) março/2003 – agosto/2003*
IQSC/USP (*mudança de nível para doutorado direto)
- **Modalidade Análises Clínicas** conclusão em dezembro/2002
UNIFAL/MG
- **Bacharelado em Farmácia** conclusão em dezembro/2001
UNIFAL/MG

2 FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- **Estágio PDEE/CAPES (doutorado *sandwich*)** 03/2006 – 02/2007

Uppsala University / Faculty of Science and Technology / Biomedical Centre / Department of Physical and Analytical Chemistry

3 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. SANTOS NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANCAS, F. M. Capillary column switching restricted-access media-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry system for simultaneous and direct analysis of drugs in biofluids. **Analytical Chemistry**, no prelo (*online* em 12/07/07), 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ac070671g>

2. FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANCAS, F. M. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. **Journal of Chromatography B**, v. 847, p. 217-223, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.01>

3. SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C.; LANCAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct plasma injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 71-76, 2006.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.001>

4. RODRIGUES, J. C.; SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; ALVES, C.; CONTADORI, A.; LANCAS, F. M. Development of an improved heated interface for coupling SPME to HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 208-212, 2006.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.002>

5. ALVES, C.; FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; QUEIROZ, M. E.; LANCAS, F. M. Optimization of the SPME parameters and its on-line coupling with HPLC for the determination of tricyclic antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, p. 340-346, 2006.
6. SEMAAN, F. S.; SANTOS NETO, A. J.; LANCAS, F. M.; CAVALHEIRO, E. Rapid HPLC-DAD determination of furosemide in tablets using a short home-made column. **Analytical Letters**, v. 38, n. 10, p. 1651-1658, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/al-200065813>
7. SANTOS NETO, A. J.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em discos SPE C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de Furnas (MG - Brasil). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500002>

4 ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. ALVES, C.; SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J. C.; LANCAS, F. M. Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid. **Journal of Mass Spectrometry**, aceito, 2007.

5 MANUSCRITOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

1. SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANCAS, F. M. Fluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**.
2. SANTOS NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANCAS, F. M. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of plasma samples in a fully capillary restricted access media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**.

6 MANUSCRITOS EM PREPARO

1. SANTOS NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANCAS, F. M. Fast analysis of albendazole and metabolites in plasma by microcolumn switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
2. SANTOS NETO, A. J.; LANCAS, F. M. Técnicas modernas de preparo de amostras e separação para análises de fármacos em fluidos biológicos.
3. RODRIGUES, B. T.; SANTOS NETO, A. J.; LANCAS, F. M. Direct injection of bovine plasma using multidimensional liquid chromatography: analysis of albendazole and metabolites.

7 PRÊMIOS

Melhor trabalho do Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Afins - XI COLACRO, Comité Científico de COLACRO XI. 2006.

8 PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS DURANTE O DOUTORADO

1. 31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2007. 2007, Ghent, Bélgica.
2. Uppsala University Chemistry Conference - UUCC 2006. 2006, Uppsala, Suécia.
3. Liquid separation-mass spectrometry (LS-MS) course. 2006-2007, Uppsala, Suécia.
4. 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – RA-SBQ. 2005, Poços de Caldas.
5. XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2005, Recife, Brasil.
6. 1º Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - BrMASS. 2005, Campinas.
7. 28th International Symposium on Capillary Chromatography & Electrophoresis. 2005, Las Vegas, EUA.
8. 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies - ExTech 2005. 2005, Campinas.
9. 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques. COLACRO 2004. 2004, Campos do Jordão.
10. XXIV Escola de Verão em Química - Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira. 2004, São Carlos.
11. XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2003, Londrina.
12. 12º Encontro Nacional de Química Analítica. 2003, São Luís.

9 CURSOS MINISTRADOS

1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Organizado pelo Instituto Internacional de Cromatografia, Abril de 2007, São Carlos.

2. Cromatografia gasosa e líquida: fundamentos e instrumentação.

Seminário na disciplina: *CEN0260 - Métodos Instrumentais de Análise Química*, ESALQ-USP, Coordenador: Prof. Dr. Francisco José Krug, Novembro de 2005, Piracicaba.

3. Análise de fármacos em fluidos biológicos: fundamentos teóricos e experimentos.

Organizado pelo Instituto Internacional de Cromatografia, Outubro de 2005, São Carlos.

4. Técnicas modernas de preparo de amostras.

Participação na disciplina de mestrado: *Preparo de amostras biológicas para a análise de fármacos*, UNIFAL/MG. Coordenadora: Prof. Dr. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, Setembro de 2005, Alfenas.

5. Análise qualitativa e quantitativa em HRGC

Parte do curso pré-congresso: *Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC)*, no COLACRO X, Outubro de 2004, Campos do Jordão.

6. Otimização das condições experimentais em LC-MS

Parte do curso pré-congresso: *Fundamentos de Espectrometria de Massas como Detector para Técnicas Cromatográficas*, no COLACRO X, Outubro de 2004, Campos do Jordão.

10 RESUMOS EM EVENTOS

1. SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, B. T. ; RODRIGUES, J. C. ; FERNANDES, C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . Direct injection of bovine plasma using multidimensional liquid chromatography: analysis of albendazole and metabolites. In: XI Congresso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines - COLACRO, 2006, Mérida, México.
2. ALVES, C. ; LIMA, P. C. G. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; LANCAS, F. M. . Methodology validation for analysis of antiepileptic drugs in plasma using solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (SPME-LC). In: XI Congresso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines - COLACRO, 2006, Mérida, México.
3. RODRIGUES, B. T. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . Avaliação de Diferentes Estratégias para a Análise de Albendazol e Metabólitos em Plasma Bovino por Cromatografia Líquida com Acoplamento de Colunas (Column Switching). In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - SIMCRO, 2006, Águas de São Pedro.
4. SANTOS NETO, A. J. ; SJÖBERG, P. J. R. ; MARKIDES, K. E. ; LANCAS, F. M. . Microcolumn switching capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry (cLC-cLC-MS/MS) for the analysis of drugs by direct injection of biofluids. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - SIMCRO, 2006, Águas de São Pedro.
5. SANTOS NETO, A. J. ; SJÖBERG, P. J. R. ; MARKIDES, K. E. ; LANCAS, F. M. . Influence of dead volume on the peak broadening in capillary column switching liquid chromatography and the hole of restricted access media columns to keep narrow peaks after the injection of large volumes of plasma. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - SIMCRO, 2006, Águas de São Pedro.
6. RODRIGUES, B. T. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . Cromatografia líquida multidimensional para análise de albendazol e metabólitos em plasma bovino utilizando injeção direta de amostra. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - SIMCRO, 2006, Águas de São Pedro.
7. FERNANDES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . SPME-LC empregando interface homemade com sistema de aquecimento - aplicação na análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - SIMCRO, 2006, Águas de São Pedro.
8. SANTOS NETO, A. J. ; SJÖBERG, P. J. R. ; BERGQUIST, J. ; LANCAS, F. M. . Column switching capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry for drug

analysis in biofluids using restricted access media (RAM) for direct injection of blood plasma. In: Uppsala University Chemistry Conference - UUCC 2006, 2006, Uppsala, Suécia

9. SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; SILVA, J. C. R. ; LANCAS, F. M. . Determinação automatizada de fluoxetina em plasma por cromatografia líquida multidimensional. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 2005, Poços de Caldas.

10. TITATO, G. M. ; SANTOS NETO, A. J. ; LANCAS, F. M. . Acoplamento entre cromatografia líquida capilar e espectrometria de massas usando uma interface electrospray (cLC-ESI-MS). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.

11. SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; TITATO, G. M. ; LANCAS, F. M. . Automated multidimensional capillary LC (c-LC/c-LC) system for the determination of drugs in biological fluids - oral presentation. In: 28th International Symposium On Capillary Chromatography & Electrophoresis, 2005, Las Vegas - NV - EUA.

12. SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; TITATO, G. M. ; LANCAS, F. M. . Determination of fluoxetine by direct plasma injection using an automated microcolumn-switching system. In: 28th International Symposium On Capillary Chromatography & Electrophoresis, 2005, Las Vegas - NV - EUA.

13. FERNANDES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . Otimização das condições da microextração em fase sólida (SPME) para a determinação de fluoxetina em plasma. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.

14. ALVES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; NASSUR, M. E. Q. ; LANCAS, F. M. . Otimização da análise de fármacos anticonvulsivantes por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia líquida empregando interface aquecida desenvolvida no laboratório. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.

15. SANTOS NETO, A. J. ; ALVES, C. ; FERNANDES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; TITATO, G. M. ; LANCAS, F. M. . Cromatografia líquida capilar multidimensional com injeção direta de amostra para a determinação de fluoxetina em plasma. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.

16. SANTOS NETO, A. J. ; ALVES, C. ; FERNANDES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; LANCAS, F. M. . Utilização de planejamento fatorial para otimização das condições de ionização de antidepressivos tricíclicos em acoplamento LC-MS. In: 1º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2005, Campinas.

17. ALVES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; FERNANDES, C. ; QUEIROZ, M. E. C. ; LANCAS, F. M. . Acoplamento SPME-LC/MS para análise de fármacos antidepressivos tricíclicos em plasma. In: 1º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2005, Campinas.

18. RODRIGUES, J. C. ; NOGUEIRA, A. M. ; ALVES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; CONTADORI, A. ; LANCAS, F. M. . Development of a new interface for online coupling stir bar sorptive extraction with high performance liquid chromatography (SBSE-HPLC). In: 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies - ExTech 2005, 2005, Campinas.

19. ALVES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; FERNANDES, C. ; QUEIROZ, M. E. C. ; LANCAS, F. M. . Validação de metodologias para análise de fármacos antidepressivos tricíclicos em plasma por SPME-LC/MS - oral communication. In: 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies - ExTech 2005, 2005, Campinas.

20. SANTOS NETO, A. J. ; ALVES, C. ; FERNANDES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; LANCAS, F. M. . Preparo de amostras on-line para análise de fármacos em plasma por injeção direta em cromatografia líquida multidimensional. In: 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies - ExTech 2005, 2005, Campinas.
21. SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; ALVES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; LANCAS, F. M. . Análise automatizada de fármacos e drogas de abuso em fluidos biológicos por cromatografia líquida multidimensional com injeção direta de plasma. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife.
22. FERNANDES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; RODRIGUES, J. C. ; ALVES, C. ; LANCAS, F. M. . Determinação de fluoxetina em plasma empregando microextração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida (SPME-LC) com interface homemade aquecida. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife.
23. ALVES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; RODRIGUES, J. C. ; LANCAS, F. M. . Otimização dos parâmetros que influenciam na ionização de fármacos anticonvulsivantes em acoplamento LC/MS utilizando planejamento fatorial. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife.
24. RODRIGUES, J. C. ; ALVES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; FERNANDES, C. ; CONTADORI, A. ; LANCAS, F. M. . Avaliação da desorção térmica em interface aquecida para SPME-HPLC na análise de antidepressivos tricíclicos e fluoxetina. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife.
25. SEMAAN, F. S. ; SANTOS NETO, A. J. ; LANCAS, F. M. ; CAVALHEIRO, E. . Rapid HPLC-DAD determination of furosemide in tablets using a short home-made column. In: 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão.
26. SANTOS NETO, A. J. ; ALVES, C. ; NASSUR, M. E. Q. ; LANCAS, F. M. . Otimização das condições de ionização de antidepressivos tricíclicos em acoplamento LC-MS utilizando planejamento fatorial. In: 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão.
27. FERNANDES, C. ; SANTOS NETO, A. J. ; SILVA, J. C. R. ; NASSUR, M. E. Q. ; LANCAS, F. M. . Determinação de fluoxetina utilizando SPME-LC. In: 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão.
28. SANTOS NETO, A. J. ; SIQUEIRA, M. E. P. B. . Análise de praguicidas organofosforados em amostras de água do lago de furnas - Apresentação oral. In: XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2003, Londrina.
29. SANTOS NETO, A. J. ; SIQUEIRA, M. E. P. B. . Otimização e validação de método para análise de praguicidas organofosforados em água pela técnica de extração em discos de fase sólida C-18. In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís.