

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LETICIA ALVES DE LIMA FERRARI

**Espectrometria de massas LCMS/MS na quantificação da
prostaglandina em amostras de saliva – aprimoramento e
validação do método**

BAURU
2023

LETICIA ALVES DE LIMA FERRARI

Espectrometria de massas LCMS/MS na quantificação da prostaglandina em amostras de saliva – aprimoramento e validação do método

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriana

Alves de Lima Ferrari, Leticia
Espectrometria de massas LCMS/MS na
quantificação da prostaglandina em amostras de
saliva – aprimoramento e validação do método/
Leticia Alves de Lima Ferrari. -- Bauru, 2023.
41 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo,
2023.

Orientadora: Profa. Dra. Bella Luna Colombini
Ishikiriana

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 92312318.4.0000.5417
Data: 12/07/2018



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO

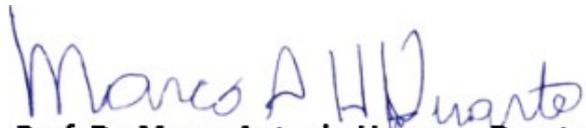
Dissertação apresentada e defendida por
LETICIA ALVES DE LIMA FERRARI
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 20 de julho de 2023.

Prof.^a Dr.^a **CAMILA DE ASSIS FLEURY**
FIB

Prof.^a Dr.^a **KARIN CRISTINA DA SILVA MÓDENA**
UNISAGRADO

Prof.^a Dr.^a **ADRIANA MARIA CALVO**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **BELLA LUNA COLOMBINI ISHIKIRIAMA**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP



USP
FACULDADE
DE
ODONTOLOGIA
DE
BAURU



Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901



www.posgraduacao.fob.usp.br



[posgraduacaofobusp](https://www.facebook.com/posgraduacaofobusp)



[fobuspoficial](https://www.youtube.com/fobuspoficial)



14 3235-8223



posgrad@fob.usp.br



[@posgradfobusp](https://www.instagram.com/posgradfobusp)



[@FobPos](https://twitter.com/FobPos)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais Marcos e Estela, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a seguir meus sonhos. Ao meu namorado Matteus, por todo o amor, apoio e compreensão durante os momentos difíceis. À minha família, pelos momentos de descontração e por me ajudarem a manter o equilíbrio emocional. Aos professores e minha orientadora Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama, que compartilharam seus conhecimentos e experiências, e me guiaram durante esta jornada acadêmica. E, por fim, agradeço a mim mesmo pela perseverança e dedicação em alcançar este objetivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama, pela paciência, sabedoria e orientação ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. Sem sua ajuda, não teria sido possível alcançar os resultados apresentados nesta tese.

Gostaria também de agradecer à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), por proporcionar as condições necessárias para a realização deste trabalho, bem como às professoras Profa. Dra. Adriana Maria Calvo, Profa. Dra. Camila de Assis Fleury e Profa. Dra. Karin Modena pela leitura cuidadosa e pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Sou grata à Profa. Dra. Adriana Maria Calvo por seus ensinamentos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à Gabriela pela amizade, apoio, paciência e toda dedicação em compartilhar seus conhecimentos. Agradeço à Viviane Siqueira, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelo apoio e companheirismo no laboratório. Agradeço também aos técnicos do laboratório Viviane, Tiago e Elza por toda ajuda prestada durante este período.

Agradeço também à minha família, pelo amor incondicional, pela compreensão e pelo incentivo ao longo desta jornada. Agradeço também ao meu namorado Matteus por toda paciência e apoio durante este período.

Por fim, agradeço a Deus pela saúde, pelo dom da vida e pela oportunidade de aprender e contribuir com a ciência. Espero que este trabalho possa contribuir para o avanço da ciência.

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroidais são fármacos que exercem seu mecanismo de ação por meio da inibição da ação da enzima ciclooxigenase, que sintetiza mediadores inflamatórios, como a prostaglandina *E2*, para combater os sintomas de dor, febre e inflamação. Desta forma, a quantificação das concentrações de prostaglandinas representa um reflexo da atividade inflamatória e da ação da ciclooxigenase nos tecidos humanos. No entanto, não existem na literatura muitos estudos que relatam a quantificação da prostaglandina, especialmente em amostras de saliva – um fluido biológico de fácil obtenção, que favorece a avaliação de moléculas como esta, por ser menos invasivas para o paciente, uma vez que para esses estudos são necessárias muitas amostras. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia do método MEPS LCMS/MS na extração e detecção de PGE2 a partir de amostras de saliva humana e validar essa metodologia a partir de amostras de saliva de acordo com as normas da ANVISA. Para tal, foram coletadas amostras de saliva, antes e após a ingestão do AINE meloxicam, utilizado como ferramenta farmacológica AINES. Estas amostras de saliva foram submetidas à extração da prostaglandina pelo método de microextração por sorvente empacotado (MEPS), por ser mais rápido e fácil de conduzir. Já para a determinação da concentração da prostaglandina presente nas amostras de saliva foi utilizada a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC MS/MS). Notou-se a diminuição dos níveis de prostaglandina E2 após a ingestão do medicamento, esses níveis começam a diminuir até 5 horas, voltando ao normal nas horas seguintes. Nos testes de validação foi possível confirmar a linearidade das amostras, obtendo um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9888791$ e a equação linear obtida foi de $(x) = 540,783 \cdot x + 447,083$ e nos testes de precisão e exatidão o resultado foi inferior a 15%. Desta forma, a metodologia de extração e quantificação de prostaglandinas a partir de saliva humana testadas, mostraram-se rápidas e eficazes, de acordo com os critérios da ANVISA e podem ser utilizadas com segurança para tal finalidade.

Palavras-chave: prostaglandina; saliva; LCMS/MS.

ABSTRACT

LCMS/MS mass spectrometry in the quantification of prostaglandin in saliva samples – method improvement and validation

Non-steroidal anti-inflammatory drugs are drugs that exercise their mechanism of action by inhibiting the action of the cyclooxygenase enzyme, which synthesizes inflammatory mediators, such as prostaglandin *E2*, to combat symptoms of pain, fever and inflammation. Thus, the quantification of prostaglandin concentrations represents a reflection of the inflammatory activity and the action of cyclooxygenase in human tissues. However, there are not many studies in the literature that report the quantification of prostaglandin, especially in saliva samples - a biological fluid that is easy to obtain, which favors the evaluation of molecules like this one, as it is less invasive for the patient, since for these studies require many samples. Thus, this work aims to evaluate the effectiveness of the MEPS LCMS/MS method in the extraction and detection of PGE2 from human saliva samples and to validate this methodology from saliva samples in accordance with ANVISA standards. . To this end, saliva samples were collected before and after the ingestion of the NSAID meloxicam, used as a pharmacological tool NSAIDs. These saliva samples were subjected to prostaglandin extraction using the packaged sorbent microextraction (MEPS) method, as it is faster and easier to conduct. For the determination of the concentration of prostaglandin present in the saliva samples, liquid chromatography coupled to the mass spectrometer (LC MS/MS) was used. A decrease in prostaglandin *E2* levels was noted after ingestion of the drug, these levels begin to decrease up to 5 hours, returning to normal in the following hours. In the validation tests it was possible to confirm the linearity of the samples, obtaining a correlation coefficient of $r^2 = 0.9888791$ and the linear equation obtained was $(x) = 540.783 \cdot x + 447.083$ and in the precision and accuracy tests the result was lower to 15%. Thus, the methodology for extracting and quantifying prostaglandins from human saliva tested proved to be fast and effective, according to ANVISA criteria and can be safely used for this purpose.

Keywords: prostaglandin; saliva; LCMS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cascata do Ácido Araquidônico	15
Figura 2 -	Metodologia empregada na técnica LCMS/MS	16
Figura 3 -	Representação da coluna no MEPS	20
Figura 4 -	Etapas de extração do MEPS	21
Figura 5 -	Cromatograma obtido após injeções dos padrões de PGE2	25
Figura 6 -	Cromatograma obtido após injeções dos padrões de Meloxicam D3	25
Figura 7 -	Gráfico m/z PGE2	25
Figura 8 -	Gráfico m/z Meloxicam D3	26
Figura 9 -	Curva de calibração PGE2 realizada após a injeção de concentrações padrão de PGE2	30
Figura 10 -	Concentrações de PGE2 em relação ao tempo	31
Figura 11 -	Concentrações de PGE2 em relação ao tempo apresentadas com desvio padrão	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição das características dos voluntários doadores de saliva	30
Tabela 2 -	Resultados dos experimentos de validação do método de quantificação de PGE2 em amostras de saliva	34

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
COX	Ciclooxigenase
LC	Cromatografia Líquida
MS	Espectrometria De Massas
LCMS/MS	Cromatografia Líquida Associada a Espectrometria de Massas
MEPS	Microextração por Sorvente Empacotado
LLE	Extração Líquido-Líquido
SPE	Extração em Fase Sólida
ESI	Eletrospray Ionizante
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA.....	14
1.2	METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE ANALITOS	16
1.3	COLETA DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA PROSTAGLANDINA E2	17
1.4	MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO (MEPS)	18
2	PROPOSIÇÃO	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	COLETA DE AMOSTRAS DE SALIVA	23
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS DE SALIVA	23
3.3	LCMS/MS	24
3.4	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	26
3.4.1	Seletividade	27
3.4.2	Efeito Matriz	27
3.4.3	Linearidade	28
3.4.4	Precisão	28
3.4.5	Exatidão	28
3.4.6	Estabilidade	29
4	RESULTADOS	30
4.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGE2	30
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE PGE2 NAS AMOSTRAS DE SALIVA ANTES E APÓS A INGESTÃO DO AINE	31
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE2 EM AMOSTRAS DE SALIVA	32
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÕES	38
7	REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Síntese da Prostaglandina

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo e possuem efeitos analgésicos, antitérmicos e antiinflamatórios. Após um trauma ou lesão tecidual, através da cascata do ácido araquidônico, são produzidas as prostaglandinas e tromboxanos, sendo as primeiras responsáveis pela geração de vários sinais e sintomas clínicos da inflamação, dentre eles a dor e esse grupo de fármacos age essencialmente na inibição da formação de prostaglandinas. (KUMMER, COELHO, 2002)

O ácido araquidônico é derivado de um ácido graxo essencial, ácido linoleico, e passa a formar fosfolipídios, que fazem parte da estrutura da membrana celular. Para que se inicie o processo de cascata do ácido araquidônico é necessário que estes estejam livres da membrana, dependendo da ação de enzimas, em especial a fosfolipase A2. Essa enzima depende da fosforilação para ser ativada, evento que acontece em resposta a eventos como a lesão celular. Após liberado das membranas celulares, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias, a via das ciclooxigenases, responsáveis pela formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela formação de leucotrienos e lipoxinas. (SILVA, 2016)

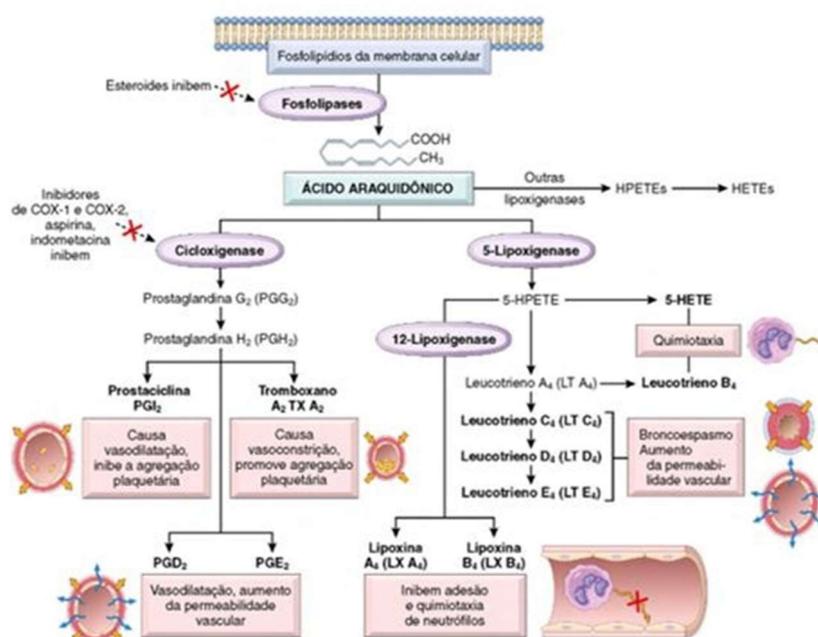


Figura 1: Cascata do Ácido Araquidônico (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006)

Como mostrado na Figura acima (**Figura 1**), a partir de uma reação com a enzima ciclooxigenase de catálise há a incorporação de duas moléculas de oxigênio ao ácido araquidônico para formação da prostaglandina G₂, em seguida, a enzima ciclooxigenase sofre uma reação de peroxidase e a prostaglandina G₂ é convertida em H₂. A prostaglandina H₂ passa então por uma série de sínteses de acordo com sua localização, para formação de outras prostaglandinas como a I₂, D₂, E₂ e tromboxano A₂. (SILVA, 2016)

A enzima ciclooxigenase pode se apresentar em duas isoformas principais, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 é uma enzima essencialmente constitutiva e sua função é a de regulação de algumas funções fisiológicas como proteção gastrointestinal, homeostase renal e plaquetária. Já a COX-2 é uma enzima de caráter indutivo, produzida após uma lesão celular, por exemplo, e está relacionada a processos de dor e inflamação. (KUMMER, COELHO, 2002)

A prostaglandina E₂, produto final da via das ciclooxigenases, é um marcador inflamatório e os AINES têm a função de inibir a atividade bioquímica das enzimas COX, em especial a COX-2, que é a principal responsável pela síntese desta prostaglandina. (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006) Desta forma, o estudo e a quantificação das prostaglandinas em fluidos ou tecidos humanos pode servir como

um importante marcador biológico da atividade inflamatória, bem como da ação e eficácia de fármacos como os AINES.

1.2. Metodologias de detecção de analitos

A análise de fluidos biológicos para estudos de farmacodinâmica vem ganhando importância nos últimos anos. Nesse contexto, a busca por um melhor entendimento sobre a eficácia dos medicamentos é um dos fatores que aumentam o interesse em métodos mais adequados para a análise de fluidos biológicos, como plasma, urina e saliva. (SANTOS NETO, 2007) A cromatografia líquida (LC) é uma técnica de separação bastante utilizada para detectar a presença de certos analitos em uma amostra. Nesta técnica, como mostra a figura abaixo (**Figura 2**), a fase móvel (ou solvente) é impulsionada por uma bomba em direção a coluna de separação, e, durante este processo, a amostra a ser analisada é adicionada a fase móvel. Após passar pela coluna de separação o eluente da coluna é direcionado a um detector que irá detectar a presença das substâncias desejadas e as informações coletadas são enviadas a um software que gera um gráfico (cromatograma) permitindo a identificação das moléculas desejadas. (LANÇAS, 2009)

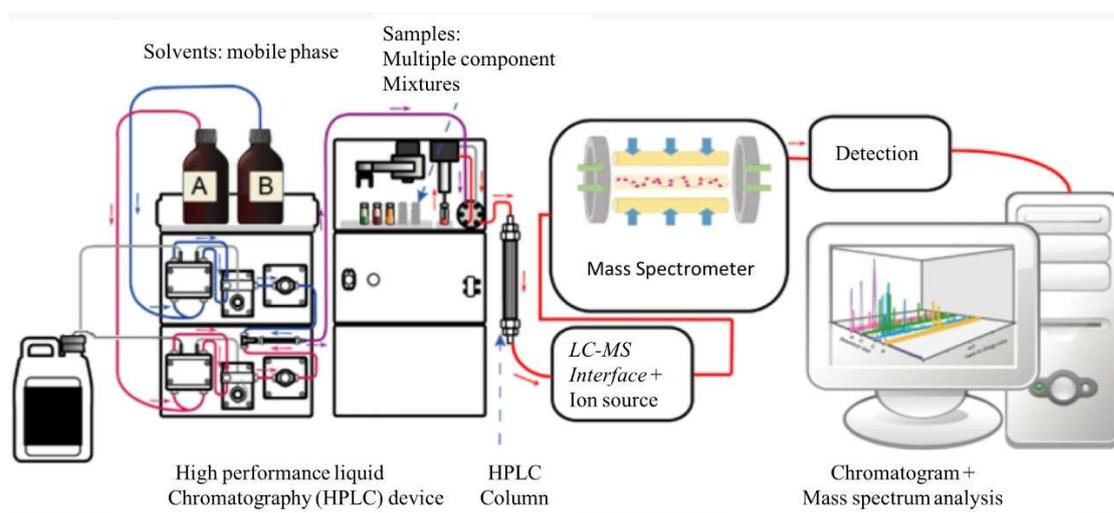


Figura 2: Metodologia empregada na técnica LCMS/MS (<https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms>)

Já para análises quantitativas é necessário o acoplamento desta coluna de separação a um espectrômetro de massas (MS), um equipamento capaz de identificar e quantificar moléculas a partir da razão da massa em relação à carga. Neste, quando

o eluente sai da coluna, passa por uma fonte de ionização e em seguida passa por um detector que irá identificar os íons de acordo com a relação massa/ carga. (KONERMANN, 2013)

O espectrômetro de massa é um instrumento usado para separar substâncias de acordo com sua razão massa/carga e determinar suas densidades. Quando um espectrômetro de massas é acoplado a cromatografia torna a seletividade da separação cromatográfica mais eficaz. Desta forma, esse método vem sendo bastante utilizado em estudos farmacológicos, principalmente quando se trata da análise de fluidos biológico. (SANTOS NETO, 2007)

1.3. Coleta de Amostras para Quantificação da Prostaglandina E2

Grande parte das pesquisas que utilizam a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (LC MS/MS) para detecção de prostaglandina, usam amostras de plasma sanguíneo, tendo em vista sua fidedignidade em relação a presença dos fármacos, seus produtos e outros analitos solúveis no corpo humano.

No entanto, a obtenção de amostras sanguíneas de pacientes humanos, principalmente nos estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, requerem a obtenção de muitas e repetidas amostras sanguíneas, que por sua vez são de difícil obtenção, por serem necessárias medidas invasivas para coleta, além da necessidade de pessoal especializado, e que podem gerar desconforto excessivo aos pacientes/voluntários de pesquisa, bem como maiores riscos à sua obtenção. Desta forma, a realização destas análises qualitativas e quantitativas em amostras não sanguíneas, como a saliva por exemplo, pode ser um importante instrumento para a coleta das amostras e realização das análises de forma menos invasiva e sem riscos aos pacientes/voluntários.

Diferentemente do sangue, a saliva é um fluido biológico de fácil obtenção, que pode ser coletado de maneira não invasiva, sem a necessidade de equipamentos ou pessoal especializado, em grande quantidade, por períodos repetidos, ao longo de vários dias, sem gerar desconforto ou quaisquer efeitos indesejados ao paciente/voluntário, o que reduz os custos, os riscos de contaminação e aumenta adesão do paciente. No entanto, são poucos e recentes, os estudos que utilizam amostras de saliva para este fim. (FELLER K; LE PETIT G, 1977)

Alguns estudos usando saliva se mostraram bastante promissores, como o estudo feito por Calvo *et al.* (2020) que buscava quantificar Piroxicam, ou Nakayama *et al.* (2010) que mediu o nível de prostaglandina durante a gestação ou ainda de Luchian *et al.* (2016) que também usou a saliva para quantificar prostaglandina, neste caso em pacientes com doença periodontal.

O estudo feito por Calvo *et al.* (2020), foi de extrema relevância nesse aspecto, pois realizou uma comparação entre a saliva e o plasma sanguíneo humano como fluido biológico para quantificação de Piroxicam. Neste, para a determinação do analito foi utilizado a cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas, sendo que este método se mostrou eficaz para os dois fluidos biológicos escolhidos, demonstrando o potencial de uso da saliva para este tipo de análise

O estudo de Nakayama *et al.* (2010) procurou avaliar a concentração da prostaglandina F2 durante o trabalho de parto, sendo a saliva escolhida como fluido biológico para análise utilizando um leito de microplacas para quantificação. Por este método também foi capaz de se detectar e analisar a concentração de prostaglandinas de maneira adequada na saliva, mostrando que há uma relação entre o nível de prostaglandina com o estágio de contração.

Já o estudo feito por Luchian *et al.* (2016) avaliou a presença de prostaglandina E2 como um marcador inflamatório associado ao tratamento periodontal, neste caso também foi usado a saliva como fluido biológico e para quantificação foi utilizado o método ELISA. Ao final do estudo foi possível observar que a concentração de prostaglandina decaiu drasticamente após o tratamento dos pacientes, com a redução do processo inflamatório.

Apesar dos estudos anteriormente citados, não existe ainda uma metodologia definida como ideal e validada na literatura que possa ser utilizada de forma eficaz e segura na extração e detecção de prostaglandinas (PGs) da saliva de pacientes humanos.

1.4. Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A etapa de extração do analito de interesse da amostra é uma das mais importantes durante uma análise, pois o método escolhido influencia diretamente na precisão e confiabilidade dos resultados obtidos. Por este motivo, na escolha do método de extração a ser utilizado deve-se dar preferência aqueles que apresentem

os melhores resultados que possuam uma menor probabilidade de erro no manuseio. (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

Nos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos muitas vezes a fase da extração se torna um fator limitante quando é preciso fazer uma análise rápida, pois quando o número de amostras é grande se leva muito tempo nesta etapa. São descritos na literatura 2 métodos que podem ser utilizados para a extração dos analitos de interesse das amostras de fluidos biológicos, a extração líquido-líquido (LLE) e suas variações, que utilizam solventes e a extração em fase sólida (SPE) que faz uso de materiais sorventes durante o processo. Ademais, novas técnicas vêm sendo descritas, como a de microextração, e estas, apresentam ainda vantagens sobre as técnicas clássicas anteriormente descritas (LLE e SPE). (ABDEL-REHIM, 2011)

A extração líquido-líquido é um método bastante utilizado com grande eficácia. É a técnica clássica utilizada para a preparação de amostras de natureza aquosa. No entanto, esta técnica de extração possui algumas desvantagens, dentre elas, permitir uma seletividade limitada, a necessidade da realização de muitos passos para preparação, o que pode gerar erro humano e a incapacidade de utilização de emulsões. Outro fator limitante é que métodos como a extração líquido-líquido (LLE) além de tomar muito tempo para preparação também despendem uma grande quantidade de insumos, tornando esse método ambientalmente pouco amigável. (ABDEL-REHIM, 2011)

A extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais comumente utilizada em laboratórios clínicos. Trata-se de uma técnica bastante interessante para extração de amostras biológicas, e foi bem aceita quando foi inserida no mercado. Apresenta boa seletividade, flexibilidade e alto potencial de automação, o que facilita sua aplicação prática. Porém o ponto negativo deste método é que para sua realização é necessária a utilização de uma coluna de extração para cada amostra a ser analisada, desta forma além de consumir uma grande quantidade de insumos durante a preparação e extração de amostras, o gasto financeiro com colunas também é alto. Foi então que surgiu a miniaturização deste método, a microextração por sorvente empacotado (MEPS), onde uma única coluna pode ser usada diversas vezes, diminuindo sobremaneira o consumo de insumos. (ABDEL-REHIM, 2011)

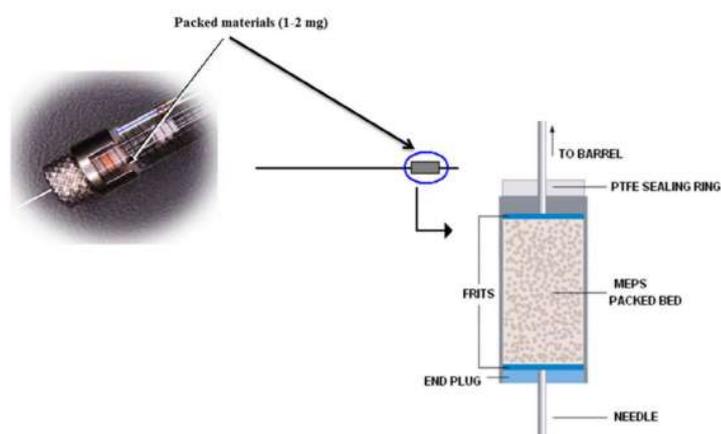


Figura 3: Representação da coluna no MEPS (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

A técnica de extração conhecida como microextração por sorvente empacotado (MEPS), é basicamente a extração sólida em miniatura. Como demonstrado na figura acima (**Figura 3**), o método utiliza um dispositivo composto com duas partes, sendo uma seringa com capacidade em torno de 250 μL e o sorvente que fica embutido na agulha, sendo esta a parte mais importante já que o sorvente é que retém os analitos presentes na amostra na coluna para depois eluí-lo por um solvente. O sorvente mais utilizado na realização desta técnica é o sorvente à base de sílica, podendo ser trocado quando necessário ou ao atingir o número de injeções recomendadas pelo fabricante. (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

Esta técnica é constituída de quatro etapas (**Figura 4**): a primeira é o condicionamento da coluna, que consiste em passar o solvente pela coluna a fim de ativar um material específico ou até mesmo remover alguma impureza. A etapa seguinte consiste na aspiração da amostra pela seringa e é nessa etapa que o analito fica retido na coluna. Posteriormente, procede-se com a lavagem, importante para eluir o(s) composto(s) presente(s) na amostra que não serão interessantes para análise, e, para isso, utiliza-se um solvente que não tenha força suficiente para dispensar o analito de interesse. Por último, para a eluição da amostra é preciso escolher um solvente que será capaz de liberar o analito retido no sorvente. (CALDAS et al., 2011; MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

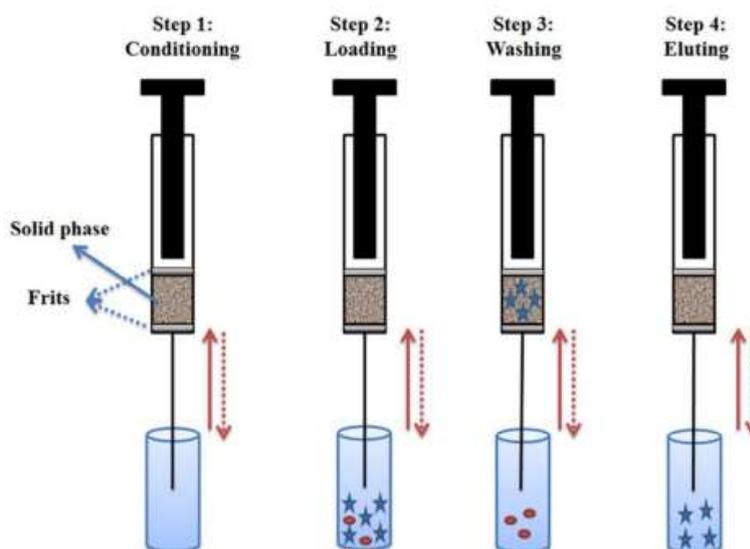


Figura 4: Etapas de extração do MEPS (MOEN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

Uma das vantagens da utilização deste método é a redução da quantidade de solvente necessário para extração, além de que a agulha pode suportar até 100 injeções antes que seja necessário realizar a troca da mesma. Outro ponto positivo desta técnica é a facilidade da manipulação do dispositivo e a diminuição do tempo de trabalho em comparação com outros métodos. Por este motivo esta foi a técnica de extração de escolha a ser utilizada neste estudo para a extração da prostaglandina a partir das amostras de saliva. (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015)

Desta forma, pudemos observar que a maioria dos estudos sobre eicosanoides, como a prostaglandina E2, foram realizados a partir de amostras de plasma, células brancas sanguíneas e líquido amniótico e que utilizam a metodologia de espectrometria de massa (LC-MS/MS) para a detecção das concentrações nestes fluidos. Existem poucos relatos de presença e detecção de PGE2 em saliva, o que motivou a realização dessa pesquisa. Ademais, não existe nenhuma padronização ou validação de método descrita na literatura para avaliação destas em amostras de saliva utilizando a metodologia LC M/MS.

2. PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem por objetivos:

- Avaliar a eficácia do método MEPS LCMS/MS na extração e detecção de PGE2 a partir de amostras de saliva humana
- Validar a metodologia de extração e detecção de PGE2 testada a partir de amostras de saliva de acordo com as normas da ANVISA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Coleta das Amostras de Saliva

Foram selecionadas amostras de saliva previamente coletadas de 16 voluntários que estavam em tratamento no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica da FOB/USP (LAFFIC), e faziam parte da pesquisa coordenada pela Profa. Dra. Adriana M. Calvo (CAAE 92312318.4.0000.5417, Parecer: 2.768.177, em 12/07/2018). Todos os participantes da pesquisa atual já possuíam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado de acordo com as recomendações estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Para a coleta, cada um dos participantes recebeu, 1 comprimido de um AINE (Meloxicam) e 17 tubos falcon de 50 mL, dos quais 4 mL deveriam ser preenchidos com saliva não estimulada. Os tubos estavam devidamente identificados com seus tempos de coleta (0 min; 15 min; 30 min; 45 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8 ;11; 24; 48; 72 e 96h - após a ingestão do AINE).

Vale salientar neste momento que o AINE ingerido pelos pacientes, foi utilizado nesta pesquisa como ferramenta farmacológica, ou seja, com o intuito de alterar propositamente os níveis séricos e conseqüentemente salivares de PGs, de tal forma a demonstrar a capacidade dos métodos testados de permitirem a extração e detecção das PGs em concentrações diferentes nas amostras de saliva coletadas.

As amostras foram armazenadas em gelo para o transporte até o laboratório e, posteriormente, os tubos falcon com as amostras foram centrifugados a 4.000 rpm, a 18°C, durante 5 minutos e o sobrenadante foi pipetado em 2 tubos de microcentrífuga estéreis, com capacidade de 2 mL cada, sendo os tubos falcon descartados em lixo contaminado. Em seguida, as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer a - 20°C, onde foram mantidas até o momento de análise por espectrometria de massa (LC MS/MS).

3.2 - Preparo das amostras de saliva

Para a realização dos experimentos, os reagentes como metanol e acetato de amônio foram obtidos da Merck® (Hohenbrunn, Germany), enquanto a água utilizada durante os testes foi obtida através do sistema de purificação Milli-q Plus (Millipore, Belford, MA, USA). Para a confecção da curva padrão de PGE2 foi utilizado o padrão

Sigma-Aldrich (11,15-dihidroxi-9-oxoprostano-5,13-ácido dienóico), pureza > 93% HPLC. Foram realizadas diluições do padrão em metanol para o preparo das soluções-estoque (100µg/mL) e a partir desta, foram confeccionados onze pontos da curva descritos a seguir: 2500; 1250; 625; 312,5; 156,2; 78,1; 39,1; 19,5; 9,8; 4,8 e 2,4 ng/mL para PGE2. As alíquotas foram congeladas no -20°C até o momento da análise da curva padrão no LC MS/MS. (DIONÍSIO *et al*, 2020)

Para a análise das amostras de saliva foi utilizada a metodologia de Microextração por sorvente empacotado (MEPS), com uma agulha acondicionada incorporada diretamente em uma seringa de injeção. Tanto a seringa MEPS como as agulhas Bin C18 foram adquiridas junto a SGE Analytical Science, Austrália. Na etapa do condicionamento da agulha foi aspirado 2 vezes 50µL de água Mili-Q e 100µL de fase móvel (metanol + 10mM acetato de amônio – 80v:20v), enquanto para a amostragem foi aspirado 100 µL da amostra de saliva e na lavagem foi usado 50 µL de água, e por fim na eluição do analito, foi utilizado a fase móvel (metanol + 10mM acetato de amônio – 80v:20v). Entre uma amostra e outra, a agulha foi lavada 5 vezes com 100 µL de metanol. Depois de extraídas as amostras seguiram para o sistema LC-MS/MS.

3.3 - LC-MS/MS

As condições de análise foram obtidas por injeção direta da solução padrão de PGE2, sem a coluna de separação, onde foram empregados íons precursores/produtos específicos. O modo MRM negativo (monitoramento de múltiplas reações) foi usado para quantificação monitorando as transições: m/z 351,1 > 271,4, 351,1 > 315,3 e 351,1 > 333,3. O tempo de análise para cada evento foi de 0,117 ms.

As áreas de pico para todos os componentes foram integradas automaticamente usando o software LabSolutions, versão 5.97 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Como mostrado nos cromatogramas (**Figura 5 e 6**) e gráfico m/z abaixo (**Figuras 7 e 8**).

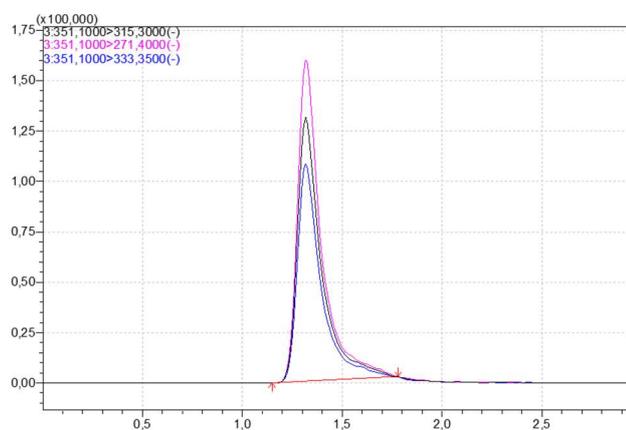
PGE2

Figura 5: Cromatograma obtido após injeções dos padrões de PGE2

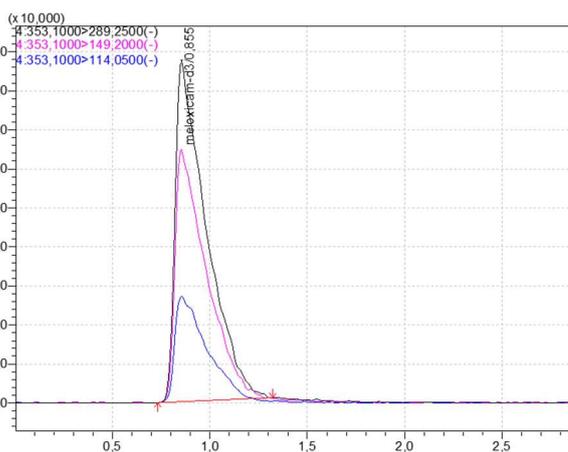
Meloxicam D3

Figura 6: Cromatograma obtido após injeções dos padrões de Meloxicam D3

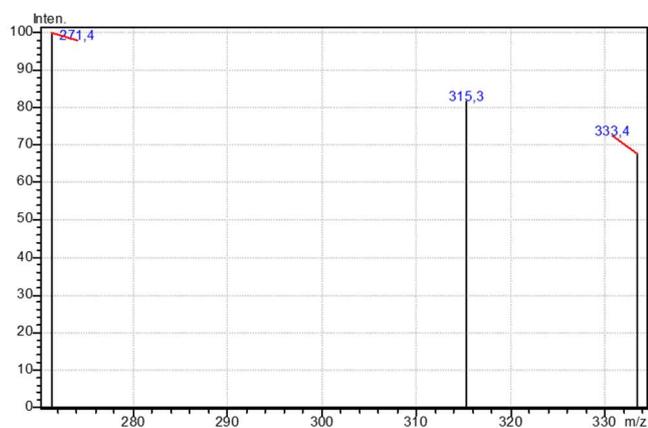


Figura 7: Gráfico m/z PGE2

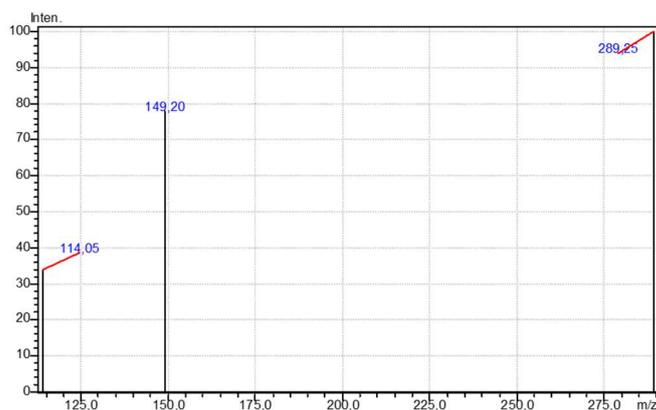


Figura 8: Gráfico m/z Meloxicam D3

A análise das concentrações de PGE2 nas amostras de saliva coletadas foi realizada utilizando o espectrômetro de massa (LC-MS/MS). A separação foi realizada através de coluna Shim-Pack XR-ODS 75Lx2.0 e pré-coluna C18 (Shimadzu, Quioto, Japão) a 40°C, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e 10mM acetato de amônio (80:20 v/v) com fluxo de injeção de 0,3 mL/min e tempo de corrida de 4 minutos. O efluente da cromatografia foi direcionado para o espectrômetro de massas - Espetrômetro de Massas Triplo Quadrupolo 8040 (MS/MS) (Shimadzu, Kyoto, Japão - EMU). A espectrometria de massa foi realizada seguindo as informações obtidas na otimização dos íons no modo ionização positiva/negativa utilizando electrospray ionizante (ESI), com seleção monitorada para a análise quantitativa. A voltagem do capilar electrospray ionizante foi de 4,5 kV. As temperaturas da fonte e dessolvatação foram mantidas em 250 e 350°C, respectivamente. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 3,0 L/min e o gás argônio como gás de colisão na pressão aproximada de 230 kPa. A voltagem do cone foi definida para cada transição e os íons moleculares das drogas foram fragmentados por energia de colisão variável. Específicos íons pai/filho serão empregados. O modo MRM (multiple-reaction-monitoring) foi usado para a quantificação monitorando as transições que surgirem nas análises.

3.4 - Validação da metodologia

Para maior confiabilidade dos resultados obtidos na quantificação da PGE2 em amostras de saliva realizou-se a validação do método, seguindo as especificações da ANVISA (Resolução da Diretoria Colegiada-RDC No. 166, de 24 de julho de 2017).

A mesma metodologia utilizada para validação já havia sido realizada pela Dra. Adriana Maria Calvo no seu projeto de pós-doutorado, FAPESP 2009/17851-8, onde foram obtidos resultados bastante satisfatórios, quando da quantificação e validação da detecção de Piroxicam em amostras de saliva humana.

A curva utilizada para o processo de validação foi a mesma utilizada no preparo das amostras de saliva, nas seguintes concentrações: 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,125; 36,0625; 19,53125; 9,765625; 4,8828 e 2,441406 ng/mL. Então foram feitos os cálculos para definição dos Controle de Qualidade de Baixa Concentração (CQB), Controle de Qualidade de Média Concentração (CQM) e Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA).

Para o preparo das amostras de saliva da curva foi pipetado 200 µl de saliva branca, acrescentado de 50 µl do ponto da curva e 2 µl de padrão interno (Meloxicam D3 a 1 µg/mL).

3.4.1 - Seletividade

O experimento de seletividade é usado para avaliar se o método escolhido é capaz de identificar e quantificar o analito de interesse em uma amostra sob influência de outros componentes que podem estar presentes na matriz (saliva), como impurezas e diluentes. Segundo a ANVISA, a única resposta analítica aceitável é a do analito. Os picos de interferência permitidos pela ANVISA são de 20% dos picos de LIQ (Limite Inferior de Quantificação) e 5% dos picos de padrão interno. (ANVISA, 2017)

Primeiro foi feito o teste de Seletividade onde é feito a injeção do Limite Superior de Quantificação (LSQ), ponto puro, P1, ponto mais alto da curva de calibração seguida de 6 amostras de saliva branca de pacientes distintos.

3.4.2 - Efeito Matriz

O Efeito Matriz faz parte dos experimentos da validação analítica para garantir que os componentes presentes na matriz não irão interferir na quantificação do analito quando o método for aplicado na rotina. (ANVISA, 2017)

O objetivo deste experimento é comparar o efeito do analito de interesse e do padrão interno na matriz (saliva) e o efeito do analito e padrão interno diluídos em metanol. Para isso foi usado saliva branca de 6 pacientes distintos, e, para cada paciente foi feita a análise dos pontos puros de CQA (P3) CQB (P9) e CQM (P4).

Para cada paciente foi feita a extração de 9 amostras de saliva branca, onde em 3 delas é feita a análise apenas da saliva, em outras 3 é colocado no mesmo vial onde já está a saliva extraída, os pontos puros (sem extrair) de cada Controle de Qualidade (CQA, CQB e CQM), por último nas outras 3 amostras além dos pontos puros também é adicionado padrão interno utilizado (Meloxicam D3 a 1 µg/mL). (ANVISA, 2017)

3.4.3 - Linearidade

O teste de linearidade é realizado para verificar se o resultado obtido pela análise é proporcional à concentração do analito na amostra em questão. Para isso é necessário traçar uma curva analítica de pelo menos 5 pontos da curva de calibração para determinar a linearidade entre a concentração do analito e o sinal obtido na análise. (ANVISA, 2017)

Neste ensaio foram preparadas e extraídas 3 curvas de calibração que foram inseridas numa mesma corrida. O cálculo dos resultados obtidos foi realizado a partir de um gráfico gerado com as respostas bem como com base na equação da reta gerada.

3.4.4 - Precisão

Todo método analítico é passível de falhas, e por isso é necessário estimar a porcentagem dessas falhas. No ensaio de precisão a amostra é preparada igualmente em momentos diferentes, para depois estimar as falhas através do coeficiente de variação que deverá estar em até 20% para LIQ e 15% para as amostras de CQ. (ANVISA, 2017)

Para isso, é necessário preparar e extrair 3 curvas de calibração em momentos diferentes para serem analisadas por espectrometria de massas. (ex: manhã/ tarde/ dia seguinte).

3.4.5 - Exatidão

Na exatidão os resultados são analisados de maneira individual em relação a um valor de referência. Para confirmar que tal método é exato é necessário no mínimo 9 pontos da curva de calibração, em três concentrações diferentes (alta, média e baixa) e o ensaio deve ser feito em triplicata e ser analisado em momentos diferentes. (ANVISA, 2017)

Então foram feitas a corrida de 3 curvas em momentos diferentes (manhã/ tarde/ dia seguinte). O cálculo dos resultados é feito a partir da razão da concentração obtida do analito pela concentração de referência, que deve estar em até 20% para LIQ e 15% para as amostras de CQ.

3.4.6 - Estabilidade

Este experimento busca avaliar se o analito em questão se mantém dentro de certos limites estabelecidos em condições específicas, como congelamento/ descongelamento. (ANVISA, 2017)

Para esse teste foram preparadas 9 amostras do Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA), 9 amostras de Controle de Qualidade de Baixa Concentração (CQB). Destas, 3 amostras de cada Controle de Qualidade foram submetidas 3 vezes ao processo de congelamento (12h de congelamento, descongelamento em temperatura ambiente) enquanto outras 3 amostras de cada Controle de Qualidade permaneceram por 12 horas na bancada em temperatura ambiente, para depois ser injetada e por fim, as outras 3 amostras de cada Controle de Qualidade foram injetadas e permaneceram 12 horas no injetor antes de serem analisadas. Para a análise dos resultados foi feita a razão da concentração obtida do analito pela concentração de referência e cálculo do coeficiente de variação.

4 RESULTADOS

As concentrações salivares de PGE2 foram analisadas a partir de amostras de saliva coletadas de voluntários até 96 h após uma única dose oral de Meloxicam (15mg). Os dados descritivos dos 16 voluntários são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Descrição das características dos voluntários doadores de saliva

Dados descritivos da amostra (n= 16)				
Feminino n (%)	Masculino n (%)	Idade - anos (média ± DV)	Peso corporal - Kg (média ± DV)	Altura - m (média ± DV)
12 (75)	4 (25)	30,87 ± 10,03	75,56 ± 17,40	1,56 ± 0,12

4.1 - Curva de calibração da PGE2

Para a análise da concentração de PGE2 na saliva, foi necessário realizar uma curva de calibração com concentrações padrão conhecidas para posterior análise de concentrações em amostras de pacientes, obtendo $r^2 = 0,9888791$ e $f(x) = 540,783 * x + 447,083$ (**Figura 9**). Considerando a estabilidade da curva, foram realizadas as análises das amostras.

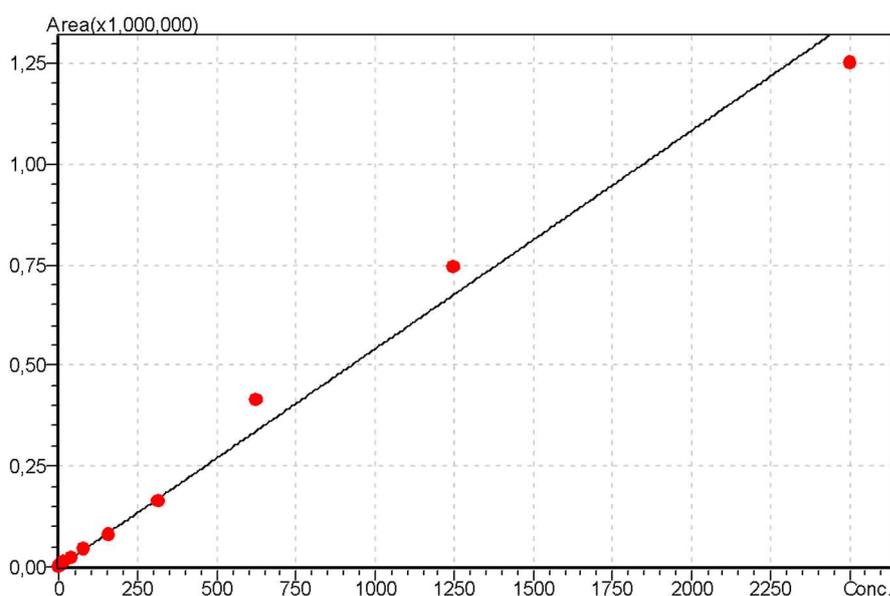


Figura 9: Curva de calibração PGE2 realizada após a injeção de concentrações padrão de PGE2 (11,15-dihidroxi-9-oxoprostano-5,13-ácido dienóico, Sigma-Aldrich), pureza > 93% HPLC. Foram

realizadas diluições do padrão em metanol para o preparo das soluções-estoque (100µg e a partir desta, foram confeccionados onze pontos da curva descritos a seguir: 2500; 1250; 625; 312,5; 156,2; 78,1; 39,1; 19,5; 9,8; 4,8 e 2,4 ng/mL para PGE2.

4.2 - Quantificação de PGE2 nas amostras de saliva antes e após a ingestão do AINE

As amostras de saliva dos pacientes foram analisadas a fim de quantificar níveis de prostaglandina E2 presente antes e após a ingestão de um comprimido de AINE (Meloxicam 15mg). Na **Figura 10 e 11** podem ser vistas as concentrações de prostaglandina E2 presente nas amostras de saliva de todos os voluntários em relação ao tempo após a administração do AINE. Apesar de não ser o objetivo do estudo, ao analisar a cinética das concentrações obtidas na saliva e detectadas pelo equipamento, notou-se que os níveis de prostaglandina na saliva dos diferentes voluntários, variou bastante com o decorrer do tempo, sem apresentar diferenças estatisticamente significativas, sendo suficientes, no entanto para permitir a avaliação dos objetivos do estudo, de quantificar a prostaglandina mesmo quando os níveis se apresentavam baixos.

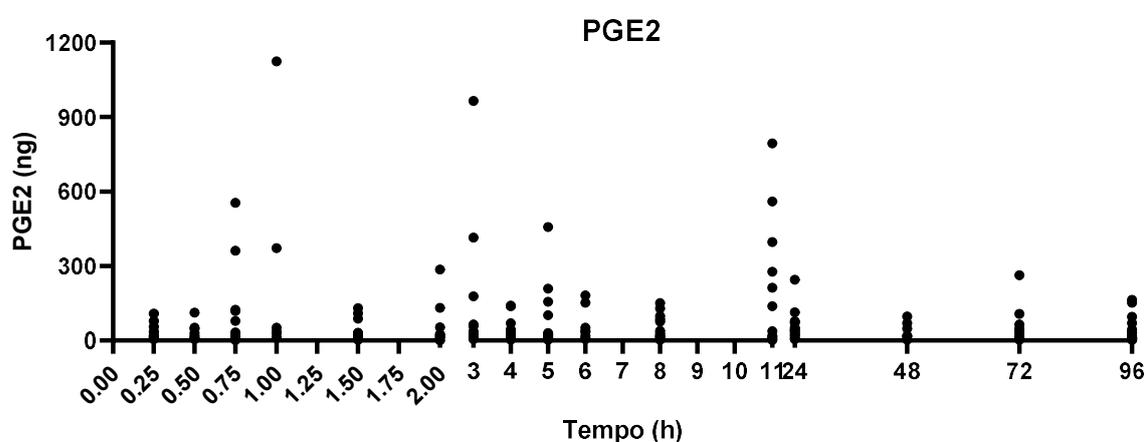


Figura 10: Concentrações de PGE2 em relação ao tempo, após a ingestão de dose única (15 mg) de Meloxicam, detectadas pelo método MEPS LCMS/MS, a partir de amostras de saliva coletadas de 16

voluntários nos seguintes períodos de tempo após a ingestão do AINE (0 min; 15 min; 30 min; 45 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8 ;11; 24; 48; 72 e 96h).

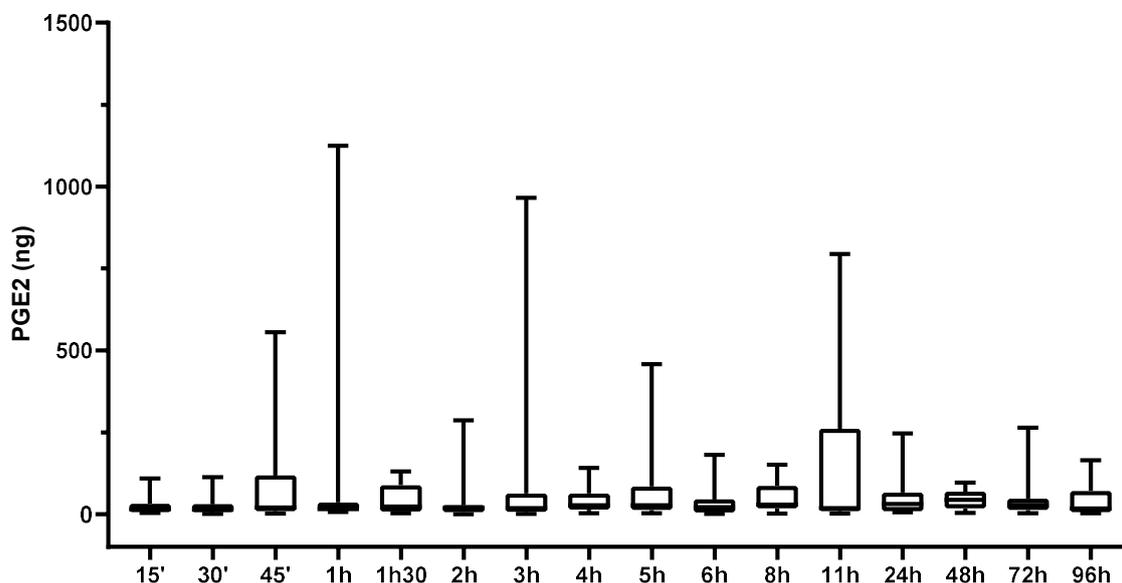


Figura 11: Concentrações de PGE2 em relação ao tempo apresentadas com desvio-padrão, após a ingestão de dose única (15 mg) de Meloxicam, detectadas pelo método MEPS LCMS/MS, a partir de amostras de saliva coletadas de 16 voluntários nos seguintes períodos de tempo após a ingestão do AINE (0 min; 15 min; 30 min; 45 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8 ;11; 24; 48; 72 e 96h).

4.3 - Validação do método de quantificação de PGE2 em amostras de saliva

Com a utilização dos métodos de extração (MEPS) seguido da quantificação por LCMS/MS foi possível notar a sensibilidade do método utilizado, tendo em vista as baixas concentrações detectadas nas análises das amostras de validação. Foi determinado por meio destas análises que o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) utilizado foi o ponto 11 da curva de calibração (2,4 ng/mL), o Controle de Qualidade Média (CQM), ponto 4 (312,5 ng/mL), o Controle de Qualidade Baixa (CQB), ponto 9 (9,8 ng/mL) e o Controle de Qualidade Alta (CQA), ponto 3 (625 ng/mL). A partir disto confirmou-se a linearidade das amostras da curva de calibração (**Figura 5**), sendo seu coeficiente de correlação $r^2 = 0,9888791$. A equação linear obtida foi $(x) = 540,783 \cdot x + 447,083$. Por fim, nos testes de precisão e exatidão o resultado foi inferior a 15%. Todos os resultados obtidos nos experimentos de validação descritos anteriormente encontram-se sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos experimentos de validação do método de quantificação de PGE2 em amostras de saliva. As amostras coletadas foram submetidas a todos os testes preconizados pela ANVISA de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada-RDC No. 166, de 24 de julho de 2017

Resultados

Validação do método de quantificação da PGE2 em amostras de saliva		
Prostaglandina		
	Concentração (ng / mL)	PI fator de matriz normalizada (CV)
Saliva (6 amostras)		
CQB	9.8	6,03
CQA	625	7,15
PI: padrão interno; CV: coeficiente de variação [(desvio padrão / média)] x 100.		
Prostaglandina E2		
Linearidade	2.4 – 1250 ng/mL	
r ²	0,9888791	
Equação da reta	f(x)=540,783*x+447,083	
Limite de quantificação (ng / mL)	2.4	
Precisão (CV %; n = 10)	11,05	
Exatidão (%)	2,02	
Precisão intra-ensaio (CV %, n = 5)		
LIQ (2.4 ng/mL)	8,08	
CQB(9.8 ng/mL)	2,4	
CQM (312.5 ng/mL)	4,47	
CQA (625 ng/mL)	8,78	
CQD (1250 ng/mL; 1:5)	2,12	
Precisão entre ensaios (CV %, n = 8)		
LIQ (2.4 ng/mL)	11,67	
CQB (9.8 ng/mL)	12,66	
CQM (312.5 ng/mL)	6,9	
CQA (625 ng/mL)	9,71	
Exatidão intra-ensaio (RE %, n = 5)		
LIQ (2.4 ng/mL)	6,38	
CQB (9.8 ng/mL)	1,06	
CQM (312.5 ng/mL)	9,65	
CQA (625 ng/mL)	3,71	
CQD (1250 ng/mL; 1:5)	6,15	
Exatidão entre ensaios (RE %, n = 8)		
LIQ (2.4 ng/mL)	-7,73	
CQB (9.8 ng/mL)	-2,85	
CQM (312.5 ng/mL)	6,54	
CQM (625 ng/mL)	6,87	
Estabilidade (RE %, n = 4)		
Estabilidade de curto prazo(12 h at 23°C)		
CQB (9.8 ng/mL)	-5,57	
CQA (625 ng/mL)	2,6	
Estabilidade pós-processamento (12 h at 4°C)		
CQB (9.8 ng/mL)	-3,72	
CQA (625 ng/mL)	3,5	
Estabilidade do ciclo de congelamento / descongelamento (-70°C)		
CQB (9.8 ng/mL)	7,68	
CQA (625 ng/mL)	-7,01	
CV, coeficiente de variação [(desvio padrão / média) x 100]; r, coeficiente de correlação linear, RE, erro relativo = [(concentração observada - concentração nominal)/concentração nominal] x 100; LIQ, limite inferior de quantificação; CQB, controle de qualidade baixa; CQM, controle de qualidade média; CQA, controle de qualidade alta; CQD, controle de qualidade de diluição.		

5 DISCUSSÃO

Neste estudo realizamos a quantificação da PGE2 em amostras de saliva humana de voluntários antes e após a ingestão de um AINE (Meloxicam 15mg), o que possibilitou a avaliação da cinética da concentração da mesma neste fluido biológico de maneira simples e eficaz, utilizando o método de LC-MS/MS. Esta estratégia metodológica utilizada foi de suma importância no desenvolvimento do trabalho, já que o fármaco utilizado neste caso possui ação direta sobre a produção da molécula de interesse (inibindo a atividade da COX), a PGE2, e deveria gerar níveis variados de produção da mesma em cada uma das amostras de cada um dos indivíduos participantes, de tal forma a permitir que os métodos e equipamentos testados pudessem demonstrar sua eficácia na detecção de concentrações variadas, não só dos padrões injetados, mas também daquelas contidas nas amostras de saliva testadas com veículo neste estudo.

Como citado anteriormente, apesar da importância da quantificação de moléculas endógenas, como a PGE2, para a realização de estudos de farmacocinética e bioequivalência, poucos foram aqueles que utilizaram amostras de saliva para tal fim, sendo dada preferência a outros tipos de matrizes, como o plasma sanguíneo considerado padrão ouro até o momento para estas análises (SIQUEIRA, V.S., 2022).

No entanto, vale ressaltar mais uma vez, que a saliva é um fluido biológico que oferece diversas vantagens em relação ao plasma sanguíneo, dentre elas: a facilidade de aquisição de diversas amostras, o que permite a coleta para estudos de avaliação em longo prazo (horas e dias consecutivos), a ausência de pessoal especializado para coleta, a ausência de riscos inerentes a punção venosa periférica, como infecção, hematomas e dor, o custo reduzido e conseqüentemente maior adesão dos voluntários na disponibilização das amostras. Todos estes fatores citados acima, foram observados durante o nosso estudo, quando do convite aos voluntários e da coleta das amostras ao longo das 96 horas de coleta, o que permitiu um estudo cinético adequado da quantificação da PGE2. Estas mesmas vantagens também foram observadas nos poucos estudos que utilizaram a saliva como amostra biológica. (ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2013; CALVO, 2016; IDKAIDEK, 2015; NAKAYAMA, 2010)

Ademais, os poucos estudos descritos na literatura que utilizam a saliva como amostra para avaliação de concentrações de fármacos, analisam a presença de anestésicos locais e outras drogas (ABDEL-REHIM, ABDEL-REHIM, 2013; ABDEL-REHIM, ALTUM, BLOMBERG, 2004; GUO, 2018; IDKAIDEK, ARAFAT, 2012, 2015). No entanto, apesar de avaliarem moléculas diferentes da analisada em nosso estudo, estes trabalhos mostraram que a saliva pode ser um fluido biológico com eficácia equivalente ao plasma sanguíneo na detecção de outras moléculas, o que pode ser comprovado em nosso estudo, que foi capaz de detectar concentrações diversas de PGE2 na mesma matriz de saliva humana.

Com este estudo, além de ser possível identificar e quantificar os níveis de prostaglandina E2 presente na saliva de forma eficaz, também foi possível notar uma variação nas concentrações da mesma, através dos resultados apresentados observou-se que os níveis de prostaglandina na saliva ao decorrer do tempo não apresentaram diferença significativa, no entanto cumpriu-se o objetivo de quantificar a prostaglandina mesmo quando os níveis se apresentavam baixos. Da mesma forma, a diminuição dos níveis de PGE2 ao longo do tempo, estão diretamente relacionadas a administração do AINE (Meloxicam 15mg) que tem por mecanismo de ação inibir a atividade da enzima ciclooxigenase, que por sua vez leva a diminuição da formação de PGE2, demonstrando que, é possível, a partir da metodologia utilizada, realizar estudos de farmacocinética relacionada ao uso de AINES e aos produtos de sua via biológica.

Assim, outro ponto relevante e positivo deste estudo é a demonstração da eficácia da metodologia utilizada para extração dos analitos das amostras de saliva, o MEPS. Por meio do emprego desta metodologia, que possui diversas vantagens em relação a outros métodos de extração - como por exemplo, o tempo operacional e a quantidade de insumos necessários, bem como a facilidade de execução da técnica aliada a menor presença de erros durante a manipulação da mesma - foi possível realizar a extração desde concentrações mais altas a mais baixas, conforme observado no gráfico de detecção de PGs. (SIQUEIRA, V.S., 2022).

No entanto, pudemos analisar uma grande quantidade de amostras (16 voluntários e 16 períodos experimentais), permitindo uma análise eficaz do analito em questão com redução do tempo experimental e ganho de qualidade nas análises, se mostrando uma técnica promissora para ser utilizada em experimento de farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) utilizando AINES.

Os testes de estabilidade feitos na validação têm como objetivo comparar as amostras armazenadas sob refrigeração e as amostras que passaram por ciclo de congelamento com as amostras que foram recém preparadas, outro ponto a ser observado é o quanto a temperatura de armazenamento interfere nos resultados. Nos testes feitos durante esse estudo, observou-se que as amostras que se mantiveram sob refrigeração durante 12h foram as que mais se mantiveram próximas as amostras que foram recém preparadas.

Por fim, gostaríamos de ressaltar a importância da validação do método de extração e detecção de PGE₂, de acordo com os critérios determinados pela ANVISA, conseguido neste estudo. Esta validação é de extrema importância uma vez que demonstra a capacidade de reprodutibilidade e confiabilidade do método, permitindo que este seja utilizado em pesquisas futuras garantindo a qualidade das análises e dos resultados observados nos mesmos. Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo realizado utilizando tais metodologias com a finalidade de detectar PGs em amostras de saliva humana, com validação da metodologia utilizada, fato que será de extrema importância para a área de estudo, uma vez que determina uma metodologia eficaz, segura e com custo/benefício para a realização de estudos envolvendo PGs.

Ademais, estudos futuros devem ser realizados utilizando a saliva como amostra biológica de interesse de tal forma a demonstrar clinicamente a importância da utilização destas metodologias em ensaios envolvendo humanos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que os métodos de extração (MEPS) bem como de quantificação (LC-MS/MS) de PGE2 em amostras de saliva testados neste estudo se mostraram eficazes, reprodutíveis e confiáveis, uma vez que permitiram alcançar todos os parâmetros e critérios preconizados pela ANVISA para tal fim, bem como detectar concentrações diversas em amostras variadas, sendo este método rápido, não invasivo e de custo reduzido e portanto, promissor para utilização em estudos futuros.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, Abbi; ABDEL-REHIM, Mohamed. Screening and determination of drugs in human saliva utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 9, p. 1188-1191, 2013.

ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Zeki; BLOMBERG, Lars G. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications, Part II, Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS-LC-MS-MS. *J. Mass Spectr.*, 39 (2004) 1488-1493, 2004.

ABDEL-REHIM, Mohamed. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ANVISA, ANdVS. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC No. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 2017.

BELLIO, Jennifer Cristina Biscarra et al. Segurança e eficácia do meloxicam associado à dipirona no tratamento da dor pós-operatória em cães. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, 2015.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. por 1604–1617, set. 2011.

CALVO, A. M. et al. Quantification of piroxicam and 5'-hydroxypiroxicam in human plasma and saliva using liquid chromatography–tandem mass spectrometry following oral administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 120, p. 212–220, fev. 2016.

DIONÍSIO, T. J. et al. Simultaneous separation of naproxen and 6-O-desmethylnaproxen metabolite in saliva samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Pharmacokinetic study of naproxen alone and associated with esomeprazole. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0236297, 11 ago. 2020.

FELLER K; LE PETIT G. On the distribution of drugs in saliva and blood plasma. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, p. 468–469, 1977.

GUO, Chao et al. Facile derivatization of ultratrace carboxylic acids in saliva for quantification by HPLC–MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 410, p. 4293-4300, 2018.

IDKAIDEK, Nasir; ARAFAT, Tawfiq. Saliva versus plasma bioequivalence of rosuvastatin in humans: Validation of class III drugs of the salivary excretion classification system. *Drugs in R&D*, v. 15, p. 79-83, 2015.

IDKAIDEK, Nasir; ARAFAT, Tawfiq. Saliva versus plasma pharmacokinetics: theory and application of a salivary excretion classification system. *Molecular pharmaceutics*, v. 9, n. 8, p. 2358-2363, 2012.

KONERMANN, Lars et al. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. 2013.

KUMMER, Carmen Luize; COELHO, Tereza Cristina RB. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 498-512, 2002.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009

MOEIN, Mohammad Mahdi; ABDEL-REHIM, Abbi; ABDEL-REHIM, Mohamed. Microextraction by packed sorbent (MEPS). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34-44, 2015.

NAKAYAMA, K. et al. Changes in 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F 2 α levels in saliva during pregnancy, labor and the postpartum period. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 36, n. 1, p. 27–33, fev. 2010.

PARK, Jean Y.; PILLINGER, Michael H.; ABRAMSON, Steven B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. **Clinical immunology**, v. 119, n. 3, p. 229-240, 2006.

SANTOS NETO, Álvaro José dos. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, Carlos Antonio Trindade da et al. O Uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico. 2016.

SIQUEIRA SANDRIN, Viviane Silva et al. Analysis of Different Methods of Extracting NSAIDs in Biological Fluid Samples for LC-MS/MS Assays: Scoping Review. **Metabolites**, v. 12, n. 8, p. 751, 2022.