



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com  
fibra oca (HF-LPME) para análise do topiramato em  
plasma e saliva por LC-MS/MS**

**Cristina Martiniano Montanari**

**Ribeirão Preto**

**2020**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com  
fibra oca (HF-LPME) para análise do topiramato em  
plasma e saliva por LC-MS/MS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Toxicologia da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientada:** Cristina Martiniano Montanari

**Orientadora:** Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 19/11/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto

2020

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.

Montanari, Cristina Martiniano

Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para análise do topiramato em plasma e saliva por LC-MS/MS. Ribeirão Preto, 2020.

114 p. : il.; 30 cm.

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

Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto

1. LC-MS/MS. 2. Topiramato. 3. HF-LPME.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristina Martiniano Monranari

Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para análise do topiramato em plasma e saliva por LC-MS/MS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à memória do meu herói,  
meu pai, Fernando Antônio Martins Montanari e  
à memória de um grande homem, meu Tio,  
Marcelo de Oliveira Batista.*

*Plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém  
lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar que  
realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de  
pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e  
que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e  
nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o  
medo de tentar. O Menestrel - William Shakespeare*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, ponto de fé, sem Ele nada seria possível.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Mara Janice e ao meu irmão Fabio Lucas, por me apoiarem no caminho que escolhi e sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Gabriel Macedo, por todo apoio, motivação, amor, companheirismo e compreensão que foram fundamentais nessa etapa.

À Professora Dra. Cristiane Maseto de Gaitani (Cris), por toda a dedicação, paciência e amizade. Muito obrigada por acreditar em mim.

Ao Professor Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal e ao técnico Aguinaldo pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, e por sempre me receberem em seu laboratório.

Aos médicos e professores do HC-FMRP Dr. Américo Ceiki Sakamoto, Dr. Veriano Alexandre Jr. e em especial a professora Dra. Priscila Lima pela parceria no projeto.

Aos colegas de laboratório: Guilherme Tinoco, Bruna Juliana, Luiza Barros e Mariana Barbieri meu muito obrigada pelo incentivo e auxílio sempre que necessário. Em especial à Marcella Galatti, colega de laboratório e ombro amigo nos períodos difíceis, me trazendo boas risadas.

Aos colegas do laboratório de metabolismo *in vitro* e técnicas de separação, Nayara Albuquerque e Daniel Carrão, pela ajuda na realização de parte deste trabalho e pela compreensão e apoio durante este período.

As amigas da vida: Camila Garcia, Marcela Montanari, Miriam Possidonio e Tayra Ferreira, pelo companheirismo e incentivo quando trabalhar e estudar parecia impossível.

Ao programa de pós-graduação em toxicologia, em especial à Rose pela dedicação e paciência.

Ao Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco por ceder as bolsas de plasma branco para esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil ( **CAPES** ) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

MONTANARI, C. M. M. **Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para análise do topiramato em plasma e saliva por LC-MS/MS. 2020.** 114f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O topiramato (TPM) é um medicamento utilizado no tratamento de crises epiléticas generalizadas e focais e no tratamento adjunto da epilepsia refratária. Devido à alta variabilidade interindividual, às interações medicamentosas e aos efeitos adversos apresentados durante a administração do TPM, a monitorização terapêutica nos pacientes que fazem uso deste medicamento é necessária para ajuste de dose individual e evitar esses efeitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME) para análise do TPM em amostras de plasma e saliva de pacientes epiléticos. A análise do TPM foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, com coluna Ascentis Express C18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 10 cm X 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Ascentis Express C 18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 3 mm X 4,6 mm), temperatura de 40°C, vazão de 0,25 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por acetonitrila:água (80:20, v/v). Nestas condições o TPM e o padrão interno (PI), prednisona foram analisados em menos de 6 minutos. Foi utilizada a ionização por electrospray (ESI) no modo negativo e as transições dos ions foram: m/z 338→78 e m/z 338→96 para o TPM e m/z 357→327 e m/z 357→123 para a prednisona. A HF-LPME foi avaliada no modo de 3 fases, usando 200  $\mu\text{L}$  de plasma ou 700  $\mu\text{L}$  de saliva, 3,5 mL de solução fosfato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0 como fase doadora. O solvente utilizado para impregnar a fibra foi o 1-octanol. Como fase acceptora foram utilizados 80  $\mu\text{L}$  de solução de hidróxido de amônio pH 12,0 para ambas matrizes biológicas. Em uma velocidade de extração de 1000 rpm e tempos de extração de 30 min e 40 min respectivamente, para amostras de plasma e saliva. As características de desempenho analítico para ambos os métodos foram avaliadas, utilizando como guias o EMA (2011) e a ANVISA (2012) sendo obtida linearidade na faixa de concentração plasmática e salivar de 1- 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e limite inferior de quantificação (LIQ) de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os ensaios de precisão e exatidão apresentaram valores abaixo de 15%, de acordo com os guias oficiais. Além disso, os métodos foram seletivos, não apresentaram efeito residual e as amostras foram estáveis. Os valores de eficiência de extração foram de 38,3 e 21,1% para amostras de plasma e saliva, respectivamente. Os métodos validados foram aplicados com sucesso em amostras de pacientes epiléticos em tratamento com o TPM. A HF- LPME apresentou vantagens, mostrando ser uma técnica promissora para análise de matrizes complexas, com reduzido consumo de solvente orgânico e possibilidade de automação.

Palavras-chave: topiramato, LC-MS/MS, plasma, saliva, microextração em fase líquida com fibras ocas.

## ABSTRACT

MONTANARI, C. M. M. **Evaluation of hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) to analysis of topiramate in plasma and saliva by LC-MS/MS2020.** 114f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Topiramate (TPM) is an antiepileptic drug that can be used in the treatment of new-onset and refractory epilepsy. Due to its high interindividual variability, drug interactions and the adverse effects presented during the TPM administration, therapeutic drug monitoring is very important to dose adjustment and to avoid toxicity effects. Thus, the goal of this study was to develop and validate the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) to analyze TPM in plasma and saliva samples of epileptic patients. TPM analysis was performed using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) with a Ascentis Express C18 (2,7 $\mu$ m, 10 cm X 4,6 mm) column equipped with a guard column filter of the same packing material, temperature of 40°C, flow rate of 0.25 mL min<sup>-1</sup> and mobile phase consisting of acetonitrile:water (80:20, v/v). Under final conditions, TPM and the internal standard (IS) prednisone were analyzed in less than 6 minutes. Electrospray ionization (ESI) was used in the negative mode and the ion transitions were: m / z 338  $\rightarrow$  78 and m / z 338  $\rightarrow$  96 for topiramate and m / z 357  $\rightarrow$  96 and m / z 357  $\rightarrow$  123 for prednisone. HF-LPME was evaluated in the three phase mode using 200  $\mu$ L of plasma or 700  $\mu$ L of saliva, 3.5 mL of sodium phosphate solution 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 6.0, into an organic phase composed of 1-octanol immobilized in the pores of the hollow fiber, and further into an acceptor phase (of ammonium hydroxide solution pH 12.0) placed in the lumen of the fiber for both biological matrices. At an stirring rate of 1000 rpm and extraction times of 30 min and 40 min, respectively, for plasma and saliva samples. Under the optimized conditions using as guides EMA (2011) and ANVISA (2012), both methods were linear over the plasmatic and salivary concentration range of 1.0–30.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and the lower limit of quantification (LLOQ) was 1.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Both methods showed good precision, accuracy (below 15%), selectivity to TPM, with no carryover and the samples were stable under the studied conditions. The extraction efficiency were 38.3 and 21.1% to plasma and saliva samples, respectively. The validated methods were successfully applied for the quantification of TPM in samples of epileptic patients. The HF-LPME showed advantages for being more suitable to analysis of complex matrices using small amount of organic solvent, and also can be automated.

Keywords: topiramate, LC-MS/MS, plasma, saliva, hollow fiber liquid- phase microextraction.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do TPM.....	4
<b>Figura 2</b> - Esquemática do dispositivo utilizado na coleta de saliva (adaptada de BUENO, 2014) .....	11
<b>Figura 3</b> - HF-LPME empregando configuração em “U” (A) e “haste” (rod-like) (B) .	15
<b>Figura 4</b> - Fotos ilustrativas contendo (A1) fibra de polipropileno, (A2) unidade de HF- LPME composta por uma fibra de polipropileno e duas ponteiros plásticas (Sorenson Bioscience, EUA) acopladas a uma tampa de poliuretano e (A3) unidade de HF-LPME inserida no tubo de extração. E (B1) fibra de polipropileno, (B2) unidade de HF- LPME composta por uma fibra de polipropileno acoplada a uma tampa de politetrafluoretileno com um septo de silicone e (B3) unidade de HF-LPME inserida em um frasco de vidro da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil) ...	16
<b>Figura 5</b> - Fluxograma referente ao desenvolvimento da HF-LPME para análise do TPM por LC- MS/MS .....	29
<b>Figura 6</b> - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em solução de acetonitrila:água (80:20 v/v) no modo negativo de ionização.....	45
<b>Figura 7</b> - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em solução de acetato de amônio $2 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo 0,1% de ácido fórmico em metanol no modo positivo de ionização .....	45
<b>Figura 8</b> - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila:tampão acetato de amônio pH 6.3 (55:45 v/v) no modo positivo de ionização .....	46
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas referentes aos padrões de A) PRE ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) TPM ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água (80:20 v/v); vazão de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .....	47
<b>Figura 10</b> - Estrutura química da PRE.....	48
<b>Figura 11</b> - Efeito do solvente orgânico na extração do TPM em plasma por HF-LPME. A extração foi realizada por 40 minutos e agitação a 1000 rpm. Comprimento da fibra 13 cm. Fase doadora: 3,5 mL de solução tampão fosfato de sódio $20 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,5 e fase aceptora solução concentrada de hidróxido de amônio pH 11,5.....	50
<b>Figura 12</b> - Gráfico de Pareto para o FFD. Avaliação dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do TPM utilizando HF-LPME em plasma. A linha vertical define o nível de confiança de 95%.....	52

<b>Figura 13</b> - Gráfico de Pareto para o FFD. Avaliação dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do TPM utilizando HF-LPME em saliva. A linha vertical define o nível de confiança de 95%.....	55
<b>Figura 14</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e pH da fase aceptora sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.....	58
<b>Figura 15</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.....	58
<b>Figura 16</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase aceptora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.....	59
<b>Figura 17</b> - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.....	59
<b>Figura 18</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e pH da fase aceptora sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.....	63
<b>Figura 19</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.....	64
<b>Figura 20</b> - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase aceptora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.....	64
<b>Figura 21</b> - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.....	65
<b>Figura 22</b> - Cromatogramas referentes à análise de amostras de plasma branco (normal, hemolisado e lipêmico) e de uma amostra de plasma fortificada com TPM (LIQ).....	71
<b>Figura 23</b> - Cromatogramas referentes à análise de amostras de saliva branco e de uma amostra de saliva fortificada com TPM (LIQ).....	71
<b>Figura 24</b> - Cromatograma referente à análise da amostra de plasma coletada no vale de um paciente em tratamento com o TPM 100 mg (concentração plasmática de $7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).....	74
<b>Figura 25</b> - Cromatograma referente à análise da amostra de saliva coletada no vale de um paciente em tratamento com o TPM 100 mg (concentração salivar de $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Métodos descritos na literatura para quantificação de TPM em amostras biológicas (pesquisa realizada a partir de 2000 na base de dados web of science) (continua).....	7
<b>Tabela 2</b> - Planejamento fatorial completo 2 <sup>2</sup> com total de ensaios e os fatores X1 e X2 codificados em níveis +1 e -1 .....	18
<b>Tabela 3</b> - Planejamento fatorial fracionário 2 <sup>3-1</sup> com total de ensaios e os fatores X1 e X2 codificados em níveis +1 e -1 .....	19
<b>Tabela 4</b> - Fatores estudados no FFD na otimização da HF-LPME para amostras de plasma e saliva.....	32
<b>Tabela 5</b> - Condições de extração por HF-LPME realizadas no FFD 2 <sup>5-1</sup> (n=3) para amostras de plasma e saliva.....	33
<b>Tabela 6</b> - Fatores e níveis utilizados no CCD para amostras de plasma .....	34
<b>Tabela 7</b> - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME para amostras de plasma .....	34
<b>Tabela 8</b> - Fatores e níveis utilizados no CCD para amostras de saliva .....	35
<b>Tabela 9</b> - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME para amostras de saliva .....	36
<b>Tabela 10</b> - Transições de íons avaliadas para o modo negativo e positivo de ionização de TPM e PI .....	44
<b>Tabela 11</b> - Condições do espectrômetro de massas para análise do TPM e da PRE por LC-MS/MS .....	47
<b>Tabela 12</b> - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de plasma.....	57
<b>Tabela 13</b> - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de saliva com adição de sal na fase doadora .....	61
<b>Tabela 14</b> - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de saliva sem adição de sal na fase doadora .....	62

<b>Tabela 15</b> - Condições estabelecidas para as técnicas de HF-LPME em amostras de plasma e saliva.....	66
<b>Tabela 16</b> - Resultado das análises de Efeito Matriz em em oito diferentes lotes de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados .....	66
<b>Tabela 17</b> - Resultado das análises de Efeito Matriz em seis diferentes fontes de saliva com adição de sal .....	67
<b>Tabela 18</b> - Resultado das análises de Efeito Matriz em em seis diferentes fontes de saliva sem adiação de sal .....	68
<b>Tabela 19</b> - Linearidade do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma.....	68
<b>Tabela 20</b> - Linearidade do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva .	69
<b>Tabela 21</b> - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridasa (n=5) do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma .....	69
<b>Tabela 22</b> - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridasa (n=5) do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva .....	70
<b>Tabela 23</b> - Estabilidade (n=3) do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma.....	72
<b>Tabela 24</b> - Estabilidade (n=3) do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva .....	73
<b>Tabela 25</b> - Estabilidade (n=3) da solução padrão de TPM .....	73

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CCD	Delineamento composto central
CE	Eletroforese capilar
CFD	Delineamento fatoria completo
CME	Concentração média experimental
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
EMA	European medicines agency
EPR	Erro padrão relativo
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Eletrospray
FAEs	Fármacos antiepilépticos
FCFRP-USP	Faculdade de ciências farmacêuticas de ribeirão preto da universidade de são paulo
FD	Função Desejabilidade
FFD	Delineamento fatorial fracionário
FMN	Fator Matriz Normalizada
FPIA	<i>Fluorescence polarization immunoassay</i> / Imunoensaio de polarização por fluorescência
GC	Cromatografia gasosa
HC-FMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HEMAC	Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibras ocas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextrações em fase líquida
LSQ	Limite superior de quantificação

MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring /</i> Monitoramento de Reação Múltipla
MTBE	Éter metil-terc- butílico
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PRE	Prednisona
r	Coeficiente de correlação
RAM	Reações adversas medicamentosas
RSM	Metodologia de superfície de resposta

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1 Epilepsia.....	2
1.2 Topiramato (TPM) .....	3
1.3 Monitoramento terapêutico da saliva.....	9
1.4 Técnica de microextração .....	11
1.4.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) .....	12
1.5 Delineamento experimental.....	16
1.5.1 Planejamento Composto Central (CCD - central composite design).....	19
1.5.2 Metodologia de Superfície de Resposta.....	20
1.5.3 Função Desejabilidade (FD).....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1 Objetivos .....	24
2.2 Objetivos específicos .....	24
<b>3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Equipamentos .....	26
3.2 Reagentes e solventes.....	26
3.3 Soluções padrão de TPM e prednisona (PRE).....	27
3.4 Avaliação das condições analíticas por LC-MS/MS .....	27
3.5 Amostras de plasma branco.....	28
3.6 Amostras de saliva branca .....	28
3.7 Aspectos éticos do estudo.....	29
3.8 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários com epilepsia .....	29
3.9 HF-LPME.....	29
3.9.1 HF-LPME de três fases para amostras de plasma.....	30
3.9.2 HF-LPME de duas fases para amostras de plasma .....	31
3.9.3 HF-LPME de três fases para amostras de saliva .....	31

3.10 Otimização do método de extração por HF-LPME .....	32
3.11 Seleção da condição ótima de extração para amostras de plasma .....	33
3.12 Seleção da condição ótima de extração para amostras de saliva .....	35
3.13 Validação do método analítico .....	37
3.13.1 Efeito matriz .....	37
3.13.2 Linearidade.....	38
3.13.3 LIQ, precisão e exatidão.....	38
3.13.4 Seletividade.....	39
3.13.5 Efeito residual.....	40
3.13.6 Estabilidade.....	40
3.14 Aplicação do método .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1 Avaliação das condições analíticas por LC-MS/MS .....	44
4.2 PI.....	48
4.3 Avaliação da HF-LPME para análise do TPM em plasma e saliva.....	49
4.3.1 Efeito da impregnação do solvente orgânico na fibra por HF-LPME três fases.....	49
4.3.2 HF-LPME duas fases .....	50
4.4 Otimização do método de extração por HF-LPME três fases.....	51
4.4.1 FFD em plasma .....	51
4.4.2 FFD em saliva .....	54
4.5 Seleção da condição ótima de extração para amostras de plasma .....	56
4.6 Seleção da condição ótima de extração para amostras de saliva.....	60
4.7 Validação do método analítico .....	66
4.7.1 Efeito Matriz .....	66
4.7.2 Linearidade.....	68
4.7.3 LIQ, Precisão e Exatidão.....	69
4.7.4 Seletividade.....	70
4.7.5 Efeito residual.....	72
4.7.6 Estabilidade.....	72
4.8 Aplicação do método .....	73
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>



<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
-------------------------	-----------

<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
--------------------	-----------

ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.....	97
---	----

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	98
--	----

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada pela presença de crises epiléticas recorrentes devido a uma atividade elétrica anormal e excessiva dos neurônios, geralmente causada por alterações estruturais e/ou bioquímicas e que envolvem predominantemente o córtex cerebral (FISHER et al., 2014).

De acordo com a Classificação Internacional Contra Epilepsia (ILAE – *do inglês International League Against Epilepsy*), as crises epiléticas são classificadas em dois grandes grupos: generalizadas e focais. Essa classificação está baseada na área de envolvimento de estruturas corticais e subcorticais durante o processo epilético (SILVIA; GALEGO; MIZIARA, 2011). Quanto a etiologia, ela pode ser classificada em: genética, quando as convulsões são resultado direto de uma alteração genética; estrutural/metabólica, que envolvem lesões do tipo derrame, traumatismo e infecção; ou de causa desconhecida (BERG et al., 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2015) a epilepsia é a desordem neurológica mais comum no mundo, afetando cerca de 65 milhões de pessoas (MOSHÉ et al., 2015) e interfere em vários aspectos da qualidade de vida do indivíduo, em diversas áreas, tais como psicológica e social, sendo primordial seu diagnóstico precoce para a implementação de terapia.

O diagnóstico de epilepsia é feito quando ocorrem, pelo menos, duas ou mais crises em um período de doze meses, na ausência de doença tóxico-metabólica ou estado febril (GRITTI et al., 2015), através de avaliação clínica detalhada como idade de início dos sintomas, evolução clínica e por exames complementares de eletroencefalograma, tomografia computadorizada e ressonância magnética (BERG et al., 2010; OGUNI, 2004).

Em pacientes com epilepsia, a forma de tratamento medicamentoso com uso de fármacos antiepiléticos (FAEs) têm o objetivo de eliminar ou reduzir as crises. Os FAEs de primeira geração (ex: fenobarbital, carbamazepina, fenitoína) possibilitam o controle das crises em menos de 70% da população, além da sua estreita margem terapêutica e grande variabilidade interindividual (PERSENIUS et al., 2015). Desta forma os FAEs de segunda geração (ex: topiramato, levetiracetam, tiagabina, gabapentina, lamotrigina) surgiram com o objetivo de proporcionar novas

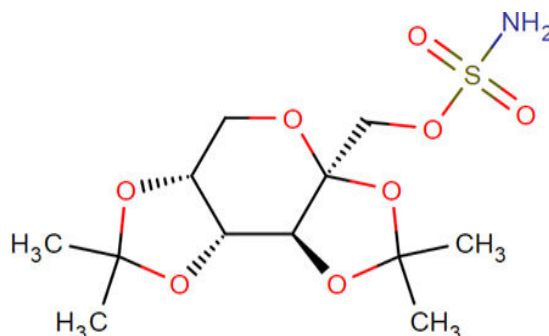
opções farmacológicas, além de trazer novas perspectivas para os pacientes com epilepsia. Mais recentemente ainda surgiram os m de terceira geração, como a lacosamida e a rufinamida (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). A procura por novos FAEs tem por objetivo promover a segurança do seu uso, com menos reações adversas, menos interações medicamentosas e que possam ser empregados em monoterapia (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009).

## 1.2 Topiramato (TPM)

O principal objetivo do tratamento da epilepsia é o controle completo das crises, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes. Dentre os FAEs encontra-se o TPM, objeto do presente estudo, que é frequentemente utilizado como comedicação nesse tipo de tratamento e também como monoterapia (HAHN et al., 2013).

O TPM (2,3:4,5-bis-O-(-1-metiletilideno)- $\beta$ -D-frutopiranosose-sulfamato) (Figura 1) é um FAE de segunda geração, derivado sulfamato de um monossacarídeo de ocorrência natural, sendo utilizado como tratamento adjuvante nas crises convulsivas parciais, na Síndrome Lennox-Gastaut e síndrome de West, em adultos e crianças (HAHN et al., 2013). Além disso, pode ser utilizado por adultos na profilaxia da enxaqueca, ou ainda quando a epilepsia e a enxaqueca coexistem (MILES et al., 2003; PERUCCA; TOMSON, 2011).

O TPM possui fórmula molecular  $C_{12}H_{21}NO_8S$ , massa molecular de 339,36 g mol<sup>-1</sup>, é um ácido fraco (pKa = 9,7), apresenta característica mais lipofílica (log p = 2,2) e não apresenta grupos cromóforos (SHANK et al., 2000). Sua administração é por via oral e os comprimidos revestidos estão disponíveis nas doses de 25, 50 e 100 mg, sendo a dose de 400 mg/dia recomendada em monoterapia para adultos com crises parciais e crises tônico-clônicas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

**Figura 1** - Estrutura química do TPM.

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em SHANK et al (2000).

Após a ingestão por via oral, o TPM é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal. A sua absorção não sofre a influência de alimentos, desta forma pode ser administrado independente do horário das refeições, com biodisponibilidade de 81 - 95% (PATSALOS, 2008). O tempo médio necessário para o alcance da concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) do TPM, em dose única, varia entre 1,4-4,3 horas (T<sub>máx</sub>) (DOOSE et al., 1996). Seu volume de distribuição (V<sub>d</sub>) é de 0,6-1 L/kg e somente 15% se liga às proteínas plasmáticas. Há uma relação linear entre a dose de TPM e a concentração plasmática. Numerosos fatores como cotratamento com medicamentos indutores de enzimas hepáticas, comprometimento hepático, idade e fatores perinatais podem afetar a relação entre dose-concentração plasmática de TPM (MILES et al., 2003).

O TPM é biotransformado por enzimas do sistema do CYP450 sofrendo hidroxilação, hidrólise e glicuronidação. Dois metabólitos foram identificados, caracterizados e isolados no plasma, urina e fezes. Os metabólitos, que conservam a maior parte da estrutura química do TPM, foram testados e não apresentaram atividade anticonvulsivante, desta forma nenhum metabólito ativo é conhecido (MANDRIOLI et al., 2010; PATSALOS et al., 2002; PEDRAZZOLI et al., 2014). A principal via de eliminação do TPM é a renal e grande parte do fármaco é excretado inalterado na urina (MANDRIOLI et al., 2010; PATSALOS et al., 2002; PEDRAZZOLI et al., 2014), apresenta meia-vida (T<sub>1/2</sub>) de eliminação de 20-30 h (PATSALOS, 2008) e é eliminado mais rapidamente em crianças. Entretanto, a magnitude do aumento da depuração em comparação com adultos varia em diferentes estudos de 25% para 170% (PERUCCA, 2013).

Atualmente, sabe-se que o TPM possui múltiplos mecanismos de ação: bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes, o que dificulta a geração e a propagação do potencial de ação nos neurônios (SHANK et al., 2000); potencialização da atividade do neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no receptor GABA<sub>A</sub> que quando ativado resulta no influxo de cloro e hiperpolarização celular (SHANK et al., 2000); antagonista dos receptores não NMDA (N-metil-D-aspartato), onde incluem-se os receptores do ácido propiônico (AMPA) e do ácido caínico (KA) do neurotransmissor excitatório glutamato (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010; SHANK et al., 2000); e inibição da anidrase carbônica que, em última análise, reduz a hiperexcitabilidade neuronal, responsável por sua ação antiepiléptica de amplo espectro para uma variedade de crises e síndromes epiléticas (LIN, 2011).

As reações adversas medicamentosas (RAM) dos FAE mais comumente relatadas são relacionadas ao SNC e periférico, sendo destacadas os efeitos sobre cognição (raciocínio lentificado, dificuldade para evocação de palavras, problemas de memória, dificuldade de concentração e lentidão psicomotora), alterações comportamentais e psiquiátricas (depressão, ansiedade, transtorno de humor, nervosismo), tontura, sonolência, parestesia, insônia e ataxia. Outras RAM incluem diminuição de apetite, perda de peso, náusea, dor de cabeça, fadiga, nefrolitíase, acidose metabólica e alterações oftalmológicas (diplopia, visão turva, glaucoma de ângulo fechado). Muitas dessas reações são mais prevalentes em pacientes em que o tratamento iniciou em doses altas e em uso de politerapia de FAEs (CONTIN et al., 2002; CROSS; RINEY, 2009; PERUCCA, 2001).

Apesar da monoterapia ser a principal escolha para o tratamento das crises por evitar interações medicamentosas, muitos pacientes necessitam da administração simultânea de mais de um FAE para alcançar melhor controle clínico da doença. Porém, a administração de vários antiepilépticos geralmente leva a mudanças nas interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, com aumento de possíveis manifestações de reações adversas (PUCCI; RAGGI, 2005). Por exemplo, a utilização clínica do TPM geralmente é associada com medicamentos já bem estabelecidos na terapia anticonvulsivante, como fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico. Porém, em todos esses casos já foi constatada influência da associação na concentração plasmática esperada para cada um dos medicamentos (TOKI; IWASAKI; ISHII, 2016). Isso se deve ao fato da metabolização dos fármacos anticonvulsivantes ser geralmente hepática e facilmente influenciada tanto por fatores intrínsecos do paciente, quanto pelos próprios fármacos em associação (PEDRAZZOLI et al., 2014), o que faz com que o uso

de terapias combinadas eleve o risco do surgimento de interações farmacocinéticas e efeitos adversos para os pacientes.

Ainda, diferentemente de outros anticonvulsivantes de uso mais estabelecido, uma faixa terapêutica de concentrações plasmáticas recomendada para o TPM ainda não é consensual, sendo propostas as faixas de 2 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (MATAR, 2010) e de 5 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (JOHANNESSEN, 2000). Esses fatores justificam a otimização do tratamento através da monitorização terapêutica com a finalidade de individualização da terapia farmacológica com o objetivo de maximizar a eficácia e minimizar os eventos adversos.

A determinação da concentração de TPM em fluidos biológicos pode auxiliar na definição da dose a ser administrada, sendo possível a individualização da farmacoterapia, o que resulta na otimização da dose para que possa atingir a resposta clínica desejada com menor incidência possível de reações adversas (CONTIN et al., 2002; FERRARI et al., 2003; HUH et al., 2013; MATAR, 2010; PATSALOS et al., 2008; TOMSON; JOHANNESSEN, 2000). Entretanto, para bioanálises, o processo de preparo da amostra deve ser realizado antes da determinação analítica. Esse procedimento visa eliminar componentes endógenos e/ou outros compostos interferentes, além de extrair e concentrar os analitos (MOREIRA; MICHIKO; YOKOYA, 2015; XIA et al., 2012).

Para isso, alguns métodos já foram descritos na literatura para a quantificação do TPM (Tabela 1), utilizando uma ampla variedade de técnicas analíticas. Dentre elas estão a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês, *high performance liquid chromatography*), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*), cromatografia gasosa (GC do inglês, *gas chromatography*) e a eletroforese capilar (CE do inglês, *capillary electrophoresis*).

Esses métodos usaram como técnica de preparo de amostra a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido (LLE do inglês, *liquid liquid extraction*) e a extração em fase sólida (SPE do inglês, *solid phase extraction*). No entanto, apesar da LLE oferecer alta reprodutibilidade, ela apresenta algumas desvantagens, como demanda tempo e trabalho laboratorial intenso, tendência a formação de emulsão, tem baixo potencial de automação e requer o uso de grande volume de solventes de alta pureza (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007). Já a SPE utiliza altas quantidades de solventes (MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011), os cartuchos de custo elevado e pouco reprodutíveis devido às diferenças entre os lotes de adsorventes (WILLE; LAMBERT, 2007). Assim, sua otimização nem sempre é simples.

**Tabela 1** - Métodos descritos na literatura para quantificação de TPM em amostras biológicas (pesquisa realizada a partir de 2000 na base de dados web of science) (continua).

<b>Autores</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Tipo de extração</b>	<b>Matriz</b>	<b>Limite de quantificação</b>	<b>Volume de amostra</b>
(WOLF; CROOKS; POKLIS, 2000)	GC-NPD	LLE	Soro	2,5 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL
(CHEN; CARVEY, 2001)	Injeção em fluxo ESI-MS	LLE	Plasma	2 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(CONTIN et al., 2001)	HPLC-MS	Precipitação proteica	Plasma	0,25 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL
BRITZI et al., 2003	HPLC-ESI-MS	LLE	Plasma e urina	0,625 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL e 1 mL
(BAHRAMI; MIRZAEI; KIANI, 2004)	HPLC-FL	LLE	Plasma	0,02 µg mL <sup>-1</sup>	1 mL
(BAHRAMI et al., 2005)	HPLC-UV	LLE	Soro	0,04 µg mL <sup>-1</sup>	1 mL
(BAHRAMI; MOHAMMADI, 2007)	HPLC-FL	LLE	Soro	0,02 µg mL <sup>-1</sup>	1 mL
MALAKOVA et al., 2007	GC-NPD	LLE	Soro	1,51 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(STALIKAS et al., 2009)	LC-MS/MS	LLE	Plasma	0,02 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(SUBRAMANI AN; BIRNBAUM; REMMEL, 2008)	HPLC-MS	SPE	Plasma	0,375 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(MANDRIOLI et al., 2010)	CE-UV	SPE	Plasma	2 µg mL <sup>-1</sup>	1 mL
(CONWAY et al., 2012)	GC-NPD	LLE	Plasma	1 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(KIM et al., 2011)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0,8 µg mL <sup>-1</sup>	0,01 mL
(SHIBATA et al., 2012)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	2,1 µg mL <sup>-1</sup>	0,05 mL
(HAHN et al., 2013)	GC-NPD	SPE	Plasma	1 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(KUHN; KNABBE, 2013)	UPLC-MS/MS	Precipitação proteica	Soro e Plasma	0,10 µg mL <sup>-1</sup>	0,05 mL
(POPOV et al., 2013)	LC-MS/MS	SPE	Plasma	0,01 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(MARTINC et al., 2014)	HPLC-FL	SPE	Plasma	0,5 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL
(MILOSHESKA et al., 2015)	HPLC-FL	LLE	Plasma	0,001 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(NI et al., 2015)	LC-MS/MS	Precipitação Proteica	Plasma	0,3 µg mL <sup>-1</sup>	2 mL



**Tabela 1** - Métodos descritos na literatura para quantificação de TPM em amostras biológicas (pesquisa realizada a partir de 2000 na base de dados web of science) (conclusão).

<b>Autores</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Tipo de extração</b>	<b>Matriz</b>	<b>Limite de quantificação</b>	<b>Volume de amostra</b>
(CIFUENTES;ME NNICKENT; DE DIEGO, 2016)	HPTL	LLE	Leite	0,3 µg mL <sup>-1</sup>	2,0 mL
(WANG et al., 2016)	SFC-MS/MS	LLE	Plasma	0.01 µg mL <sup>-1</sup>	0,1mL
(EL-YAZBI et al., 2016)	FS	Precipitação proteica	Plasma	0.1 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(YIN et al., 2016)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0.03 µg mL <sup>-1</sup>	0,01 mL
(DUPOUEY et al., 2016)	UHPLC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0.2 µg mL <sup>-1</sup>	0,25 mL
(IBRAHIM et al., 2017)	HPLC-FL	Precipitação proteica	Plasma	0.01 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL
(MILOSHESKA; ROŠKAR, 2017)	UHPLC-MS/MS	LLE	Plasma	0.1 µg mL <sup>-1</sup>	0,1 mL
(YIN et al., 2017)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0.03 µg mL <sup>-1</sup>	0,01 mL
(ISHIKA WA et al., 2018)	CE-C4D	LLE	Plasma	1 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(PARK et al., 2018)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0.01 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(LIU et al., 2019)	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	0.01 µg mL <sup>-1</sup>	0,05mL
(POPOV et al., 2013)	LC-MS/MS	SPE	Plasma	0,01 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(MARTINC et al., 2014)	HPLC-FL	SPE	Plasma	0,5 µg mL <sup>-1</sup>	0,5 mL
(MILOSHESKA et al., 2015)	HPLC-FL	LLE	Plasma	0,001 µg mL <sup>-1</sup>	0,2 mL
(NI et al., 2015)	LC-MS/MS	Precipitação Proteica	Plasma	0,3 µg mL <sup>-1</sup>	2 mL

CE-UV: capillary electrophoresis–ultraviolet; CE-C4D: capillary electrophoresis with capacitively-coupled contactless conductivity detection;FS: do inglêsfluorescence spectroscopy; GC-NPD: gas chromatography- nitrogen– phosphorus detector; HPLC-MS: do inglês High-performance liquid chromatography–mass spectrometry; HPTLC:thin-layer chromatographic; HPLC-FL: High-performance liquid chromatography– fluorescence; HPLC-UV: High-performance liquid chromatography-ultraviolet;LC-DAD: Liquid chromatography-diode array detector; LC- MS/MS: Liquid chromatography–mass spectrometry; LC-MS/MSLC: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; SFC-MS/MS: Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, UHPLC-MS/MS:Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, SPE: Solid-phase extraction; LLE: Liquid–liquid extraction.

### 1.3 Monitoramento terapêutico do TPM na saliva

Atualmente, a busca de métodos de avaliação de fármacos com o uso de matrizes biológicas menos complexas e não invasivas tem se intensificado. Neste sentido, a saliva como amostra biológica progrediu nos últimos anos e poderá ser uma matriz de primeira escolha (SANTOS, 2014). Os avanços tecnológicos tornaram possível a detecção e quantificação de substâncias químicas, hormônios, fármacos e agentes infecciosos na saliva ou fluido oral. O termo fluido oral é preferido para amostras recolhidas a partir da boca, pois engloba além da saliva, resíduos de alimentos e de outros materiais presentes (CHOO; HUESTIS, 2004).

A saliva é um fluido biológico, aquoso, hipotônico, transparente, com pH entre 6,0 – 8,0 e é composta por 99,0% de água, 0,3% de proteínas (principalmente amilase), 0,3% de mucina (KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008; SANTOS et al., 2007), além de uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos (HUMPHREY et al., 2001). A saliva é secretada diretamente na cavidade bucal pelas glândulas salivares maiores e menores (SANTOS et al., 2007; KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008).

O mecanismo de passagem dos fármacos do sangue para a saliva é por ultrafiltração ou difusão passiva, podendo ser detectada a forma molecular nesta matriz. Essa passagem é restringida para as moléculas que apresentam alta massa molecular, fármacos na forma ionizada ou ligadas às proteínas plasmáticas (BORDIN, et al., 2015).

As concentrações do analito na saliva podem se correlacionar com as concentrações plasmáticas, em muitos casos reflete de maneira direta a fração livre de fármacos presente na circulação (JACOB III et al., 2011). A difusão passiva é o mecanismo mais comum de transferência da substância ativa para a saliva. Essa difusão só pode ser feita por moléculas não ionizadas e com massa molecular menor que 500 Da. Outro fator que influencia essa passagem é o pH da saliva e do plasma e o pKa, configuração espacial e lipossolubilidade do analito. O pKa do fármaco e a diferença de pH entre plasma e saliva vão determinar o quanto de fármaco chegará a saliva. O pH da saliva geralmente é menor que o do plasma (CHOO; HUESTIS, 2004).

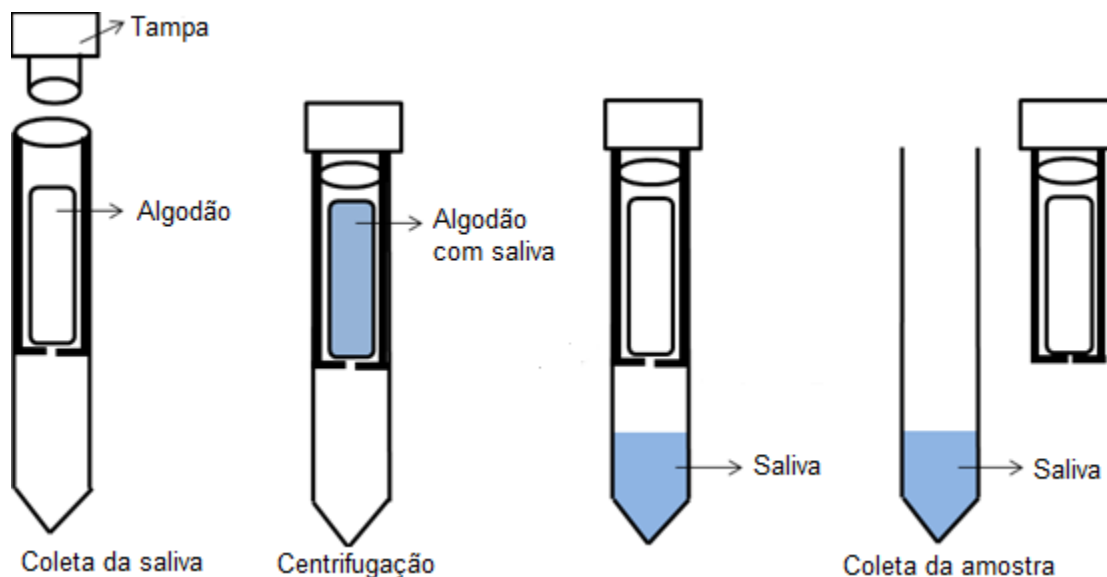
O monitoramento terapêutico de diversos fármacos em saliva geralmente tem se apresentado menos invasivo ao paciente e barato em relação ao uso de outros

fluidos biológicos (CHOO; HUESTIS, 2004). A saliva possui como principais vantagens a facilidade de obtenção, facilitando a coleta de maiores volumes de amostra, a coleta pode ser assistida e é de baixo custo (SANTOS, 2014). O risco de contração de infecção durante a coleta é mínimo e pode ser utilizada em situações em que é difícil a obtenção de outro tipo de amostra, como por exemplo, em crianças ou pacientes com deficiência ou em pessoas ansiosas (SANTOS, 2014). A dor, o medo de agulhas e as potenciais complicações associadas com as punções sanguíneas como sangramento são evitadas no monitoramento terapêutico realizado pela saliva. Médicos do setor de neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP) observaram que pacientes em tratamento com o TPM apresentam certa dificuldade na coleta de amostras de sangue, podendo ter crises epiléticas no momento da mesma. Além disso, para obter amostras de sangue são necessários serviços de técnicos especializados em coleta sanguínea, que pode onerar este tipo de análise (GORODISCHER et al., 1994).

A desvantagem, no entanto, é a possibilidade de contaminação por drogas utilizadas por via oral, e o restrito número de estudos que avaliam a interferência dos coletores, adulterantes e exposição passiva (BORDIN et al., 2015; VINDENES et al., 2011).

A coleta de saliva é bastante simples, porém é necessário que os pacientes estejam cientes do protocolo de coleta. Devem ser estabelecidos tempos corretos para coleta da saliva, para evitar que o paciente tenha escovado os dentes e evitar ingestão de alimentos e bebidas (com exceção de água) ao menos 30 minutos antes da coleta e enxaguar a boca com água destilada (CHIAPPIN et al., 2007). A coleta da saliva pode ser feita pelo depósito direto da matriz em um tubo coletor ou pelo dispositivo comercial “*Salivette*®”. Este apresenta um rolo de algodão que mede aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento que é capaz de absorver o fluido oral que contém, predominantemente, saliva e também pequenas quantidades de fluido das fendas gengivais, de restos celulares e de sangue (KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008). O algodão é colocado na boca do paciente por um ou dois minutos e então colocado dentro de um pequeno frasco plástico. Posteriormente este frasco é centrifugado liberando a saliva para análise (Figura 2) (MYLONAS et al., 2006).

**Figura 2** - Esquemática do dispositivo utilizado na coleta de saliva (adaptada de BUENO, 2014).



Fonte: Elaborada pelo autor, com base em Bueno (2014).

Os anticonvulsivantes e seus metabólitos são relativamente estáveis ao ambiente salivar (ROSENTHAL et al., 1995). Geralmente a saliva é congelada após a coleta, sendo que estudos demonstram que a maioria dos anticonvulsivantes é estável a esse congelamento e até mesmo ao aquecimento (BAUMANN, 2007; RYAN et al., 2003). Existe apenas um estudo que investiga a distribuição do TPM na saliva e sua correlação de distribuição saliva/plasma em crianças e adultos com epilepsia. Utilizou-se o método de imunoensaio de fluorescência polarizada (do inglês, *Fluorescence polarization immunoassay*) e verificou-se que o TPM se distribui na saliva de tal forma que sua concentração salivar é semelhante a sua concentração plasmática, com razão de distribuição saliva/plasma média de 0,9 ( $\pm 0,12$ ) e uma correlação de  $r^2 = 0,97$  (MILES et al., 2003).

#### 1.4 Técnica de microextração

O preparo de amostra é uma etapa prévia à introdução da amostra no sistema analítico e constitui um aspecto de grande importância. Este processo compreende um conjunto de operações orientadas a evitar as dificuldades derivadas da complexidade da matriz e da excessiva diluição da amostra. Geralmente são procedimentos físicos e físico-químicos nos quais é frequente o emprego de duas fases para alcançar uma separação global com ou sem pré-concentração (BORGES, 2015).

Assim, devido às desvantagens das técnicas mais tradicionais de preparo de amostra, as pesquisas nesta área têm sido focadas em melhorar esta etapa analítica com o intuito de simplificar, miniaturizar e automatizar esse procedimento. Outra questão em foco é a redução do consumo de solventes orgânicos tóxicos e desenvolvimento de procedimentos menos danosos ao meio ambiente sem perder o compromisso com a eficiência da extração (AGUIRRE et al., 2015; PROSEN, 2014; REZAAE et al., 2010).

Baseado nisso, várias técnicas de microextração em fase líquida (LPME – *liquid phase microextraction*) tem sido exploradas e reduzem significativamente a proporção do volume do solvente. Dentre elas encontra-se a microextração em gota suspensa (SDME – *single drop microextraction*), a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME - *hollow fiber - liquid phase microextraction*), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE – *stir bar sorptive extraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME – *dispersive liquid-liquid microextraction*) (KOKOSA, 2013).

#### **1.4.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)**

As extrações baseadas em fibras têm aumentado nos últimos anos, os avanços e descobertas em desenhos moleculares de materiais e fabricação de fibras têm sido muito importantes para a expansão das tecnologias em processos de separação moderna (DA LA GUARDIA; GARRIGUES, 2011).

Duas configurações básicas de fibras de extração podem ser usadas: as fibras planas (*flat sheet*) e as fibras ocas (*Hollow fibers*). A primeira configuração requer a implementação de um dispositivo de extração para suportar a fibra (usualmente colocada no meio dos dispositivos) enquanto que a fibra oca tem forma capilar e pode ser auto suportada (DA LA GUARDIA; GARRIGUES, 2011).

Em 1999, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen inovaram o procedimento de microextrações em fase líquida com a introdução de fibras ocas constituídas de polipropileno. A HF-LPME vem sendo considerada desde então uma evolução dentre as técnicas de microextração em fase líquida por visar o uso reduzido de solventes (15 – 20  $\mu\text{L}$ ) (DE OLIVEIRA et al., 2008; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). A configuração da fibra oca oferece uma série de vantagens devido às suas características de módulo e desenho, tais como: (1) uma área maior de fibra por unidade de volume; (2) auto suporte mecânico para

suportar uma lavagem para a separação líquida e (3) facilidade na manipulação durante a fabricação do módulo e o processo de operação (HIDAL; ISMAIL; WRIGHT, 2015).

Esta técnica consiste na impregnação dos poros de fibras capilares porosas e hidrofóbicas (fibra oca) com o solvente orgânico de extração e o preenchimento do seu lúmen com microlitros de uma fase aceptora. Para a impregnação dos poros, a fibra oca é imersa no solvente orgânico, por poucos segundos, para imobilizar o solvente. Após o preenchimento da fibra com a fase aceptora, a fibra é colocada dentro de um frasco contendo a solução aquosa doadora (amostra) onde a extração ocorre. Os analitos são extraídos a partir da solução aquosa em direção ao lúmen da fibra, sob agitação, migrando para a solução aceptora. Após o tempo de extração, a solução aceptora é retirada da fibra oca com auxílio de uma microseringa e realizada a análise (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

A HF-LPME é uma técnica baseada no equilíbrio entre as fases (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008) e que necessita da otimização de alguns parâmetros durante o desenvolvimento do método como: velocidade de agitação, força iônica (% de NaCl), tempo de extração, pH da amostra e da fase aceptora (no sistema de três fases) e seleção adequada do solvente orgânico para a impregnação na fibra (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; TAHMASEBI; YAMINI; SALEH, 2009).

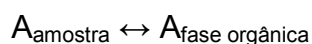
Entre as vantagens desta técnica estão: baixo custo da fibra, o que permite que cada unidade de extração seja utilizada uma única vez, evitando problemas de carregamento de amostra (“*carry over*”) ou de contaminação cruzada (BEN-HANDER et al., 2015; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007), baixo consumo de solvente orgânico, eficiente “*clean up*” da amostra, já que o tamanho dos poros garante a ocorrência de microfiltração (BEN-HANDER et al., 2015; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; ZHOU et al., 2012) e um alto fator de pré-concentração pode ser obtido, e calculado pela equação 1 (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002).

$$E = \frac{V_d \times R}{100 \times V_a} \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual E corresponde ao fator de enriquecimento, V<sub>d</sub> é o volume da fase doadora, R é a recuperação e V<sub>a</sub> é o volume da fase aceptora.

A principal desvantagem da técnica é o tempo relativamente longo de extração (30-50 minutos) (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008), mas embora esse intervalo de tempo seja considerado elevado em comparação com outros métodos de extração, várias amostras podem ser preparadas simultaneamente, o que minimiza o efeito deste longo tempo (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

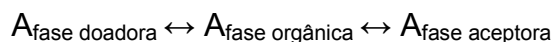
Esta técnica pode ser utilizada de dois modos: com duas ou três fases de acordo com as características do analito em questão. No sistema de duas fases os analitos são extraídos a partir de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico (fase aceptora), o qual se encontra imobilizado nos poros e no interior dessa fibra (fase aceptora) (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012), ou seja, o analito é extraído da amostra aquosa através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da fibra, passando para o mesmo solvente que se encontra no lúmen da mesma (DE OLIVEIRA et al., 2008). Como não há contato direto do solvente orgânico (fases aceptoras) com a matriz aquosa (fase doadora) é possível aplicar agitação constante durante a extração (PEDERSEN- BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Este processo é representado pelo equilíbrio abaixo:



onde A representa a concentração do analito de interesse.

O modo de duas fases é mais adequado para compostos não polares, ou seja, com alta solubilidade em solventes orgânicos (ARCE et al., 2009).

No modo de 3 fases a fibra oca é utilizada para separar três fases líquidas. Os analitos de interesse são extraídos a partir de uma solução aquosa (fase doadora), através da camada fina de solvente orgânico imobilizado nos poros de uma fibra oca (fase orgânica) para outra solução aquosa, no interior da fibra (fase aceptora) (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003), ou seja, o analito é extraído de uma amostra aquosa através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da fibra, passando para uma solução aquosa presente no lúmen da fibra. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora, impedindo o contato entre as duas fases (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000). Este processo pode ser ilustrado pelo seguinte equilíbrio:



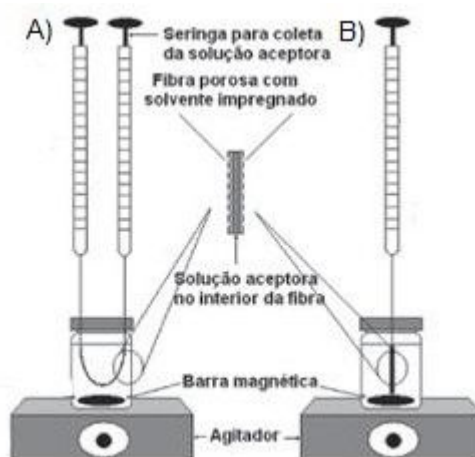
Independentemente do modo como esta técnica é realizada, o pH da fase doadora deve ser ajustado para que o composto permaneça em sua forma não ionizada, para diminuir a solubilidade do analito no meio aquoso e favorecer sua passagem para o solvente orgânico. O pH da fase aceptora, no caso de 3 fases, deve ser ajustado para que o composto se torne ionizado, favoreça sua solubilidade na fase aceptora aquosa e impeça o seu retorno para o solvente orgânico (HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010). A passagem do analito ocorre por difusão passiva a partir da fase aquosa para a fase orgânica contida nos poros da fibra oca, e, posteriormente, para a solução aceptora contida no lúmen da mesma (HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Após o processo de extração, a fase aceptora pode ser diretamente analisada por HPLC, CE ou LC-MS (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Posto isso, em relação à eficiência da extração, a mesma é dependente da partição do composto entre: fase doadora  $\leftrightarrow$  solvente orgânico  $\leftrightarrow$  fase aceptora aquosa ou orgânica (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Há duas configurações principais em que a HF-LPME é empregada, onde a fibra encontra-se em dois tipos de formatos: configuração em "U" (Figura 3A), e configuração tipo "haste" ("rod-like") (Figura 3B) (DE OLIVEIRA et al., 2008).

**Figura 3** - HF-LPME empregando configuração em "U" (A) e "haste" (rod-like) (B).

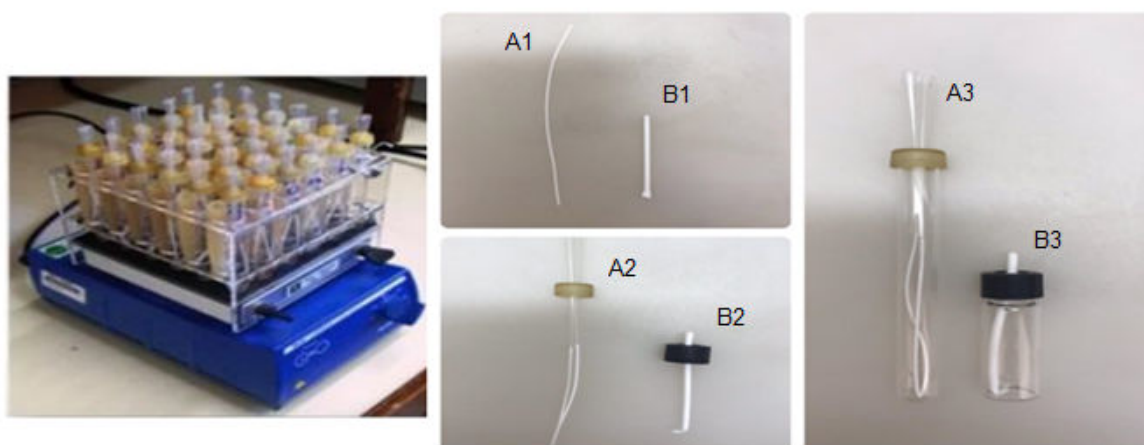


Fonte: Adaptada pelo autor, com base em DE OLIVEIRA et al. (2008).



Mais recentemente, Magalhães e Bonato (2008) desenvolveram um novo sistema na configuração em “U”, na qual a fibra de extração é suportada por duas ponteiros, através das quais, a fase aceitadora é introduzida e retirada (Figura 4). Esse sistema juntamente com o modelo em haste foi empregado no desenvolvimento dos métodos aqui relatados, usando um sistema de agitação de até 36 amostras simultaneamente.

**Figura 4** - Fotos ilustrativas contendo (A1) fibra de polipropileno, (A2) unidade de HF- LPME composta por uma fibra de polipropileno e duas ponteiros plásticas (Sorenson Bioscience, EUA) acopladas a uma tampa de poliuretano e (A3) unidade de HF-LPME inserida no tubo de extração. E (B1) fibra de polipropileno, (B2) unidade de HF- LPME composta por uma fibra de polipropileno acoplada a uma tampa de politetrafluoretileno com um septo de silicone e (B3) unidade de HF-LPME inserida em um frasco de vidro da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Vários solventes orgânicos têm sido utilizados, como éter diexílico, -n-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol, ou a mistura deles (DE OLIVEIRA et al., 2008). Dentre todos esses solventes, o 1-octanol tem mostrado resultados eficientes para inúmeras aplicações por apresentar maior recuperação dos analitos e uma quantificação adequada (BAHRAMI et al., 2017; HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012; HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; PIROOZI et al., 2014).

### 1.5 Delineamento experimental

Grande parte dos métodos propostos em química analítica são otimizados através do uso de metodologias univariadas, nas quais uma variável é otimizada de

cada vez. Esse processo requer um grande número de experimentos, grande quantidade de reagentes e tempo, além da impossibilidade de avaliar a interação entre os fatores (BEZERRA et al., 2008; MONTGOMERY, 2013; ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014). Os planejamentos univariáveis podem falhar desde que o efeito de um fator for dependente dos outros fatores envolvidos (CAMPOS et al., 2007; FERREIRA et al., 2007a; VIDAL et al., 2004), com isso, procedimentos envolvendo otimizações pelas técnicas multivariadas vem sendo muito usados por serem mais econômicos e efetivos, onde várias variáveis são otimizadas simultaneamente, evidenciando as interações entre as mesmas (ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014). Neste contexto o uso de delineamentos experimentais têm aumentado recentemente para a otimização de técnicas de extração (GIACOMINO et al., 2011; MIOR et al., 2013; SERESHTI; KARIMI; SAMADI, 2009; STALIKAS et al., 2009).

De maneira geral, os planejamentos experimentais trabalham com fatores chamados variáveis independentes em diferentes valores ou níveis. Os níveis são as condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos, geralmente identificados por nível baixo (-) e nível alto (+) (CASS; CASSIANO, 2015). Os planejamentos podem ser classificados como de primeira ordem, quando estão relacionados com a triagem dos fatores que exercem influência na eficiência do método (DEJAEGHER; VANDER HEYDEN, 2011, MONTGOMERY, 2013), no qual o planejamento fatorial é um exemplo de primeira ordem e foi a ferramenta escolhida para a otimização do método de extração por HF-LPME. Em um planejamento fatorial o efeito define-se como a mudança na resposta produzida pela mudança do nível baixo (-) para o nível alto (+) do fator. Os níveis codificados como baixo e alto são relacionados com valores reais, por exemplo, pH 5 e 9 e temperatura 30 °C e 50 °C. Além disso, o planejamento fatorial tem como finalidade estudar uma resposta chamada variável dependente (BOX; BEHNKEN, 1960; CASS; CASSIANO, 2015).

O total de ensaios realizados depende do número de fatores e de níveis. Assim,  $n^x = n^\circ$  total de ensaios a serem realizados. Quando temos dois fatores estudados em dois níveis, então  $2^2 = 4$  ensaios (BOX e BEHNKEN, 1960; CASS; CASSIANO, 2015).

O planejamento fatorial completo (CFD – *complete factorial design*) é muito utilizado para triagem dos fatores com o objetivo de verificar qual deles possui maior

impacto na resposta. Ele possibilita reduzir o número total de fatores a serem investigados nos próximos planejamentos. Dessa forma, espera-se eliminar fatores importantes antes de investir em planejamentos mais elaborados. O planejamento fatorial completo mais simples é o  $2^2$  representado na Tabela 2 (LI, 2003; MONTGOMERY, 2013; MYERS, 2003).

**Tabela 2** - Planejamento fatorial completo  $2^2$  com total de ensaios e os fatores X1 e X2 codificados em níveis +1 e -1.

Ensaio	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1

Se o número de fatores utilizados em um planejamento fatorial completo se torna elevado ainda que ele seja de dois níveis, o número de ensaios resultantes no estudo pode se tornar razoavelmente grande. Um planejamento fatorial completo  $2^5$  perfaz um total de 32 ensaios. Uma maneira de evitar este problema é realizar apenas uma fração específica do planejamento fatorial completo e o planejamento passa a denominar-se planejamento fatorial fracionário (FFD – *fractional factorial design*). Assim, pode ser realizada uma meia fração ou um quarto de fração. Exemplificando, a meia fração do planejamento  $2^5$  é representada  $2^{5-1}$  perfazendo metade do total de ensaios, ou seja, 16 ensaios (MYERS, 2003; LI, 2003). Esse tipo de planejamento é excepcionalmente importante quando um grande número de variáveis (5 ou mais, por exemplo) necessita ser testado e o experimentador não têm informações iniciais sobre quais são realmente os fatores importantes (MONTGOMERY, 2013; CASS; CASSIANO, 2015).

Define-se um FFD como um experimento em que apenas uma fração das combinações de um planejamento fatorial completo é selecionada de maneira adequada. Diversas estratégias garantem a seleção adequada dos ensaios. Em um exemplo simples, primeiramente, denota-se que  $2^{3-1} = 2^2$ . A partir do planejamento fatorial completo  $2^2$ , apresentado acima na Tabela 2 inicia-se a construção do FFD. Apesar deste planejamento ter o número de ensaios do  $2^{3-1}$  igual a 4 ensaios, ele não possui a coluna do terceiro fator X3. Esta coluna é construída multiplicando-se

os sinais de  $X_1$  pelos de  $X_2$  para obter  $X_1 * X_2 = X_3$ . Desta forma, obtém-se o FFD  $2^{3-1}$  (Tabela 3). Planejamentos fatoriais fracionários maiores podem ser construídos multiplicando os sinais das colunas do planejamento fatorial completo (NIST/SEMATECH, 2018).

**Tabela 3** - Planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$  com total de ensaios e os fatores  $X_1$  e  $X_2$  codificados em níveis +1 e -1.

Ensaio	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	+1
2	-1	+1	-1
3	+1	-1	-1
4	+1	+1	+1

Tanto na realização do planejamento fatorial completo quanto do fracionário, o experimentador pode realizar apenas uma réplica para a obtenção dos dados, pois o objetivo é identificar quais variáveis são as mais importantes. Além disso, na grande maioria dos casos, uma ou mais variáveis não apresentam nenhuma influência sobre a resposta (CASS; CASSIANO, 2015).

Após a identificação das variáveis mais significativas de um dado processo de otimização, é possível empregar algumas ferramentas multivariadas que permitem a realização de um ajuste fino das condições experimentais para, por meio de experimentos bem direcionados, identificar as melhores condições de trabalho. Essas ferramentas são classificadas como planejamentos de segunda ordem. Dentro desse contexto, pode ser utilizado o planejamento do tipo Composto Central (FERREIRA et al., 2007a).

### 1.5.1 Planejamento Composto Central (CCD - central composite design)

O CCD é o planejamento mais utilizado para experimentos, sendo capaz de gerar modelos quadráticos completos e sendo possível fornecer informações relevantes para aplicação dos métodos estatísticos de análises (HIBBERT, 2012; SERESHTI; KARIMI; SAMADI, 2009).

O arranjo do tipo CCD é recomendado quando o planejamento fatorial necessita de experimentação sequencial. Isto porque, estes projetos podem

incorporar informações de um experimento fatorial apropriadamente planejado (DE ALMEIDA et al., 2018).

Este planejamento é formado pela combinação de três partes: (1) um planejamento fatorial de dois níveis fracionário ou completo, (2) pontos axiais, de um planejamento em estrela, no qual os pontos estão a uma distância  $\alpha$  do centro e (3) pelo menos um ponto central (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; NOVAES et al., 2017; TARLEY et al., 2009). Sendo assim, todos os fatores são estudados em cinco níveis ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ ) (BEZERRA et al., 2008). Para sua construção, deve-se definir o número de fatores a serem otimizados ( $k$ ), o tipo de planejamento fatorial ( $2^{k-p}$ , se o fatorial for completo  $p = 0$ , se fracionário  $p > 0$  e  $p$  é um número inteiro) e o número de réplicas do ponto central. O número de experimentos ( $N$ ) para sua aplicação é dado por  $N = k^2 + 2k + pc$ , onde  $pc$  é o número de experimentos no ponto central. Os valores  $\alpha$  dos pontos axiais dependem do número de variáveis e podem ser calculados por  $\alpha = 2(k-p)/4$ . Para duas, três e quatro variáveis, por exemplo, seus valores são, respectivamente, 1,41; 1,68 e 2,00 (NOVAES et al., 2017; TARLEY et al., 2009).

A partir dos dados gerados, pode-se então desenvolver a metodologia de superfície de resposta (RSM – *response surface methodology*) assim como pode ser definida a condição ótima de análise realizando-se o cálculo da desejabilidade (BEZERRA et al., 2008).

### 1.5.2 Metodologia de Superfície de Resposta

A RSM é uma ferramenta eficiente na otimização de parâmetros a serem avaliados e baseia-se na variação simultânea de vários fatores (variáveis independentes), previamente selecionados por sua influência nas propriedades da metodologia estudada e variáveis dependentes, ou seja, as respostas (CARNEIRO et al., 2005).

Compreende um grupo de técnicas estatísticas para explorar e construir modelos matemáticos que se baseiam no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais (BEZERRA et al., 2008). Através de um planejamento cuidadoso e análise dos resultados, a RSM permite relacionar a resposta obtida e os fatores estudados que a afeta. Permite calcular a resposta em níveis intermediários que não foram realizados experimentalmente e direcionar para o objetivo desejado

aumentando ou diminuindo a resposta. Além disso, a RSM permite que seja estimada a interação e até mesmo os efeitos quadráticos dos fatores possibilitando saber o formato da superfície da resposta estudada (BEZERRA et al., 2008; DEJAEGER; VANDER HEYDEN, 2011). É utilizada com objetivo de encontrar condições ótimas ou melhorar as condições já utilizadas, apontar problemas ou pontos fracos no processo, melhorar a robustez em relação a influências externas ou não controláveis (MUTHUKUMAR; MOHAN; RAJENDRAN, 2003).

### 1.5.3 Função Desejabilidade (FD)

Para uma abordagem eficiente, a sistematização de técnicas computacionais podem estimar a melhor combinação dos fatores que resulte na melhor combinação possível das respostas, considerando a importância relativa de cada resposta para o sistema estudado. O emprego da FD é uma das técnicas que permite uma resolução para esse tipo de problema, que foi proposta inicialmente por Harrington e, posteriormente modificada por Derringer e Suich (1980).

A FD é um dos métodos mais utilizados para otimizar experimentos multivariáveis, onde permite encontrar condições que forneçam a resposta mais desejada, a qual, têm-se uma combinação de múltiplas respostas dentro de limites previamente estabelecidos, evitando que alguma resposta fique fora desses limites (NIST/SEMATECH, 2018).

Para utilizar a FD é necessário estimar a relação das respostas em função dos fatores estudados. Esta estimativa é realizada por planejamentos experimentais e a aplicação de RSM. Derringer and Suich (1980) propuseram um dos mais conhecidos métodos de FD onde se obtém uma desejabilidade total utilizando a média geométrica das respostas normalizadas (ou individuais) (FERREIRA et al., 2007b), conforme demonstrado na Equação 2.

$$D_i(Y_i) = (d_1 \times d_2 \times d_3 \dots d_n) \times \frac{1}{n} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde n é o número de respostas.

Sabendo-se que o objetivo é a resposta maximizada, o valor de  $D_i(Y_i)$  fica próximo de 1 quanto mais as respostas ficam otimizadas, e se alguma das respostas estiver fora da faixa desejável, toda a função terá valor zero. Ou seja, se  $D_i(Y_i)$  resultar em um valor otimizado ou maior que o valor mais alto estabelecido, este não apresentará diferença na otimização, mas se  $D_i(Y_i)$  resultar em um valor indesejável, menor que o valor mais baixo estabelecido, então terá valor zero (BEZERRA et al., 2008; LIU; TANG, 2010).

Objetivos



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos**

Avaliar a técnica de microextração HF-LPME para determinação do TPM por LC-MS/MS em amostras de plasma e saliva de pacientes em tratamento atendidos pelo HCFMRP/USP.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar um método para extração do TPM em amostra de plasma utilizando a HF-LPME com auxílio de delineamentos experimentais;
- Desenvolver e validar um método para extração do TPM em amostra de saliva utilizando a HF-LPME com auxílio de delineamentos experimentais;
- Aplicar os métodos em amostras de plasma e saliva de pacientes em tratamento e atendidos pelo HCFMRP/USP.

*Material, Casuística e Métodos*

### 3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Equipamentos

Para as análises foi empregado um cromatógrafo a líquido modelo Shimadzu (Kyoto, Japão), que consiste em um sistema com injetor Shimadzu SIL-10AD VP, uma bomba Shimadzu LC-10AD VP e um forno Shimadzu CTO-10AS VP, um espectrômetro de massas Triplo Quadrupolo (Micromass Quattro LC) (Kyoto, Japão), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) e uma bomba seringa Cole Parmer (Vernon Hills, Illinois 60061). Foi utilizada a coluna Ascentis Express C18 (2,7  $\mu$ m, 10 cm X 4,6 mm) da Sigma Aldrich<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) acoplada a uma coluna de guarda Ascentis Express C18 (2,7  $\mu$ m, 5 mm X 4,6 mm), da Sigma Aldrich<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). O nitrogênio utilizado como gás de interface e gás de nebulização foi produzido por um gerador Whatman (Maidstone, Reino Unido). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram tratados usando o software *MassLynx* 3.4.

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções foram pesados em balança analítica Sartorius modelo MSU225P (Anchieta, Brasil). Um aparelho de ultrassom da Quimis modelo Q3350 (Diadema, Brasil) foi empregado na desgaseificação das soluções e também para a remoção do excesso de solvente da fibra utilizada na extração. Para homogeneizar as soluções, um agitador de tubos Ika modelo MS 3 digital (Staufen, Alemanha) foi utilizado. A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação da Gehaka<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Também foi utilizado um peagâmetro da marca HANNA HI5221 (São Paulo, Brasil), uma centrífuga (marca Hitachi e modelo HIMAC CF 15D2, Tóquio, Japão) e um agitador do tipo *vibrax* Ika modelo VXR basic (Staufen, Alemanha) para a realização das microextrações.

#### 3.2 Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) utilizados no procedimento de preparo de amostra por HF-LPME foram o fosfato de sódio monobásico (Dinâmica<sup>®</sup>, Diadema, São Paulo), fosfato de sódio dibásico anidro (Synth<sup>®</sup>, Diadema, Brasil), cloreto de sódio (Merck<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), acetato de amônio (Dinâmica Química<sup>®</sup>, Diadema, Brasil), hidróxido de amônio e ácido fórmico (Synth<sup>®</sup>, Diadema, Brasil).

Os solventes orgânicos (grau analítico) avaliados para a impregnação da fibra foram dibutil éter, 1- octanol, (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA), acetato de butila (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Seelze, Alemanha), n-hexil etér (Alfa Aesar<sup>®</sup>, Ward Hill, EUA), éter metil-terc-butílico (MTBE) (JT Baker<sup>®</sup>, Center Valley, EUA) e clorofórmio (Tedia<sup>®</sup>, Fairfield, EUA).

A acetonitrila utilizada na fase móvel e o metanol (grau HPLC) utilizado para o preparo das soluções de trabalho foram adquiridos da marca J. T. Baker<sup>®</sup> (Estado do México, México).

### 3.3 Soluções padrão de TPM e prednisona (PRE)

O padrão analítico do TPM (grau de pureza  $\geq 98\%$ ) foi obtido da Toronto Research Chemicals Inc<sup>®</sup> (Toronto, Canadá) e o padrão da PRE (grau de pureza  $\geq 98\%$ ) utilizado como PI foi adquirido da Sigma Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, EUA).

As soluções estoque de TPM e PRE foram preparadas em metanol ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e guardadas em frascos âmbar a  $-20^\circ\text{C}$  para uso no preparo das soluções de trabalho de TPM (300; 200; 150; 100; 50 e  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e PRE (200;  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a serem utilizadas durante a otimização das condições para análise por LC-MS/MS e para a otimização das condições da HF- LPME.

### 3.4 Avaliação das condições analíticas por LC-MS/MS

A avaliação das condições de MS/MS, escolha do modo de ionização, identificação do íon precursor e dos íons produtos, a seleção da energia de colisão (CE) e a voltagem do cone mais favorável para a análise do TPM e do PI, foram realizadas pela injeção das soluções individuais de cada padrão (TPM e PRE) no espectrômetro de massas, em ambos os modos de ionização, positivo e negativo.

As soluções de injeção, de cada padrão, foram obtidas por diluição das soluções estoque até a concentração de  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , em fase móvel, e realizada a infusão na vazão de  $10 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$  em bomba seringa usando uma seringa (Hamilton, Reno, EUA). Com o objetivo de simular a vazão da condição cromatográfica, também foi realizada a infusão pós-coluna, onde uma peça em T foi acoplada ao sistema LC-MS/MS, a qual foi introduzida entre o final da coluna analítica e a fonte de ionização. Para essa infusão, a vazão de infusão foi constante a  $250 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ . As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM -

*Multiple Reaction Monitoring*) das moléculas desprotonadas  $[M-H]^-$  e seus respectivos fragmentos.

Para realização dos ensaios no modo negativo, o solvente utilizado para dissolução dos analitos (TPM e PRE) foi composto por uma solução de acetonitrila:água (80:20 v/v), já para o modo positivo de ionização foi utilizado como solvente de dissolução uma solução de acetato de amônio  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo 0,1% de ácido fórmico em metanol e também uma solução de acetonitrila:tampão acetato de amônio pH 6,3 (55:45 v/v). Esses ensaios foram baseados na literatura (CONTIN et al., 2001; KUHN; KNABBE, 2013; MATAR, 2010; PARK et al.; 2008).

Após o ajuste das condições de monitoramento pelo espectrômetro de massas, soluções de TPM ( $0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e PRE ( $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram utilizadas para análise das condições cromatográficas. Para limpeza foi utilizada solução de acetonitrila:água (50:50, v/v).

### 3.5 Amostras de plasma branco

As amostras de plasma utilizadas para o desenvolvimento do método (livre do fármaco em questão) foram obtidas pela doação do Serviço de Hemoterapia do Hospital São Francisco, na cidade de Ribeirão Preto - SP (HEMAC). Todas as amostras foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de uso.

Previamente a etapa de extração do analito por HF-LPME, o plasma utilizado foi descongelado à temperatura ambiente e foi centrifugado a  $2300 \times g$  por 15 minutos, a  $4^\circ\text{C}$  para sedimentação de qualquer material particulado.

### 3.6 Amostras de saliva branco

A saliva branco (livre do fármaco em questão) foi doada por voluntários do projeto. A coleta foi realizada em Salivette<sup>®</sup>, nos quais os voluntários geraram aproximadamente 1,5 mL de saliva por tubo. Os voluntários não ingeriram nenhum alimento ou líquido nos 30 minutos antecedentes a coleta e lavaram a boca com água destilada antes da coleta. Os tubos de Salivette<sup>®</sup> foram então centrifugadas a  $2300 \times g$  por 15 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . Todas as amostras foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de uso.

### 3.7 Aspectos éticos do estudo

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP) (Anexo A), Protocolo CEP/FCFRP n°. 2.625.464.

Anteriormente a coleta das amostras dos pacientes foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B), o qual foi assinado pelos mesmos.

### 3.8 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários com epilepsia

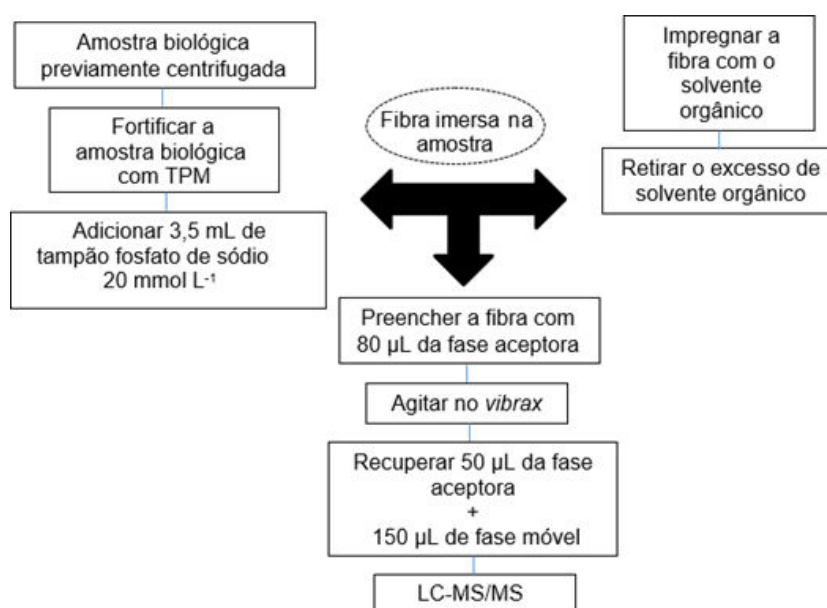
Foram incluídos nesse estudo pacientes (n=3) do sexo feminino ou masculino, a partir dos 18 anos de idade que estavam em tratamento com o TPM e atendidos pelo HCFMRP/USP.

Foram excluídos desse estudo pacientes menores de 18 anos, pacientes altamente debilitados ou pacientes que não estivessem em tratamento com o TPM.

### 3.9 HF-LPME

A figura 5 representa um fluxograma geral da extração por HF-LPME.

**Figura 5** - Fluxograma referente ao desenvolvimento da HF-LPME para análise do TPM por LC- MS/MS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.9.1 HF-LPME de três fases para amostras de plasma

A configuração em “U” da HF-LPME de três fases foi utilizada como técnica de extração para as amostras de plasma. A configuração usada é composta por uma fibra cilíndrica oca porosa (Accurel PP Q3/2, Alemanha) composta de polipropileno, de diâmetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , espessura da parede de 200  $\mu\text{m}$ , tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  cortadas no comprimento de 13 cm, ligada a duas ponteiros plásticas acopladas à uma tampa de poliuretano que evita vazamentos durante a extração.

Para isso, em um tubo de vidro de fundo redondo, 200  $\mu\text{L}$  de plasma previamente centrifugado foi fortificado com 20  $\mu\text{L}$  da solução de TPM (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  da solução de PRE (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e então foram adicionados 3,5 mL de solução de fosfato de sódio 20  $\text{mmol L}^{-1}$  nos diferentes valores de pH a serem otimizados.

Para a impregnação do solvente na fibra, esta foi imersa no solvente orgânico por 15 segundos em ultrassom (BAHRAMI et al., 2017) e o excesso desse solvente foi removido por imersão em água deionizada por 5 segundos (BEN-HANDER et al., 2015; HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012; NCUBE et al., 2016). Após isto, a fibra foi então colocada no tubo de fundo redondo de vidro contendo a amostra aquosa – fase doadora (composta de plasma fortificado com TPM, PRE e tampão fosfato de sódio em diferentes valores de pH a serem otimizados) e 80  $\mu\text{L}$  da fase aceptora (solução concentrada de hidróxido de amônio nos diferentes valores de pH a serem otimizados) foi injetada no interior dessa fibra com o auxílio de uma microseringa. Os tubos foram agitados à temperatura ambiente ( $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) em diferentes velocidades e tempos de extração a serem otimizados. Após a extração, 50  $\mu\text{L}$  da fase aceptora foram recuperados, e o volume completado para 200  $\mu\text{L}$  com fase móvel para realização da análise por LC-MS/MS. As análises foram realizadas em triplicata ( $n=3$ ).

Os valores de pH das fases doadora (pH 7,5) e aceptora (pH 11,5), velocidade de 1000 rpm e tempo de agitação de 40 min foram pré selecionados para comparação com o método de HF- LPME de duas fases, descrito no item seguinte. Para impregnação da fibra, foram avaliados os seguintes solventes orgânicos: dibutil éter, 1- octanol, acetato de butila, n-hexil etér, MTBE e clorofórmio.

### 3.9.2 HF-LPME de duas fases para amostras de plasma

Para avaliar o uso da HF-LPME de duas fases para a extração do TPM, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item anterior, porém, o solvente orgânico selecionado (1- octanol) imobilizado nos poros da fibra foi também utilizado como fase aceptora no lúmen da mesma. Após a agitação dos tubos por 40 min, 50  $\mu\text{L}$  da fase aceptora foram recuperados e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. O resíduo foi redissolvido em 200  $\mu\text{L}$  de fase móvel e feita a análise por LC-MS/MS.

### 3.9.3 HF-LPME de três fases para amostras de saliva

A configuração em “haste” da HF-LPME de três fases foi utilizada como técnica de extração para as amostras de saliva. A configuração usada é composta por uma fibra cilíndrica oca porosa (Accurel PP S6 / 2, Alemanha) composta de polipropileno com diâmetro interno e externo iguais a 1,8 e 2,6 mm, tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  cortadas no comprimento de 6 cm, conectada em um septo de silicone acoplado a uma tampa de politetrafluoretileno que evita vazamentos durante a extração.

Para isso, em um tubo de vidro de fundo redondo, 700  $\mu\text{L}$  de saliva previamente centrifugada foi fortificada com 70  $\mu\text{L}$  da solução de TPM ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e então foram adicionados 3,5 mL de solução de fosfato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  nos diferentes valores de pH a serem otimizados.

Para a impregnação do solvente na fibra, esta foi imersa em 1- octanol por 15 segundos em ultrassom e o excesso desse solvente foi removido por imersão em água deionizada por 5 segundos. Após isto, a fibra foi então colocada no tubo contendo a amostra aquosa – fase doadora (composta de saliva fortificada com TPM e solução tampão fosfato de sódio) e 80  $\mu\text{L}$  da fase aceptora (solução concentrada de hidróxido de amônio em diferentes valores de pH a serem otimizados) foi injetada no interior dessa fibra com o auxílio de uma microseringa. Os tubos foram agitados em vibrax à temperatura ambiente ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Após a extração, 50  $\mu\text{L}$  da fase aceptora foram recuperados, e o volume completado para 200  $\mu\text{L}$  com fase móvel para realização da análise por LC-MS/MS. As análises foram realizadas em triplicata (n=3).



Os valores de pH das fases doadora e acceptora, velocidade e tempo de agitação foram determinados na etapa de otimização do método de extração por HF-LPME para amostras de saliva descrita no item 3.13.

### 3.10 Otimização do método de extração por HF-LPME

A identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME foi feita empregando o planejamento experimental. A extração nessa etapa foi realizada utilizando-se 200 µL de plasma fortificado com 20 µL da solução de TPM e PRE nas concentrações de 100 µg mL<sup>-1</sup> e 200 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente e 700 µL de saliva fortificada com 70 µL da solução de TPM na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Um FFD ( $2^{k-p} = 2^{5-1}$ ) de resolução V com 5 fatores foi realizado: A) pH da fase doadora B) pH da fase acceptora C) efeito da adição de sal (força iônica) D) velocidade de agitação e E) tempo de agitação. Foram avaliados dois níveis dos fatores apresentados e os experimentos foram realizados em triplicata, gerando uma matriz composta por 16 diferentes condições de extração (n=48). Os fatores e níveis deste planejamento estão dispostos na Tabela 4, e os experimentos gerados na Tabela 5. A recuperação do TPM foi utilizada como resposta e os resultados foram avaliados pelo software estatístico *Minitab* 18.0. Os fatores que apresentaram efeitos estatisticamente significativos foram selecionados para realização do CCD.

**Tabela 4** - Fatores estudados no FFD na otimização da HF-LPME para amostras de plasma e saliva.

Variáveis	Níveis	
	Baixo(-1)	Alto(+1)
pH da fase doadora	6,5	7,5
pH da fase acceptora	10,5	11,5
Força iônica (%)	0	2
Velocidade de agitação (rpm)	500	1000
Tempo de agitação (min)	30	40

**Tabela 5** - Condições de extração por HF-LPME realizadas no FFD  $2^{5-1}$  (n=3) para amostras de plasma e saliva.

Experimento	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	+
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+

### 3.11 Seleção da condição ótima de extração para amostras de plasma

Um CCD foi empregado para avaliar a condição ótima de extração. Os fatores pH da fase doadora, pH da fase aceptora e tempo de agitação foram incluídos no CCD para otimização das respostas máximas do TPM pelo método de extração por HF-LPME três fases. A velocidade de agitação foi fixada em 1000 rpm.

O CCD  $2^3$  (2 níveis com 3 fatores) foi realizado com 6 corridas axiais (pontos estrela) e 3 pontos centrais totalizando 17 experimentos ( $2^3 + (2 \times 3) + 3 = 17$ ) realizados em triplicata (n = 51). O valor de  $\alpha$  foi  $\pm 1,682$  para estabelecer a condição de rotabilidade. Os fatores e níveis deste planejamento estão dispostos na Tabela 6, e os experimentos gerados na Tabela 7. A recuperação do TPM foi utilizada como resposta e os resultados foram avaliados pelo software estatístico *Minitab* 18.0.

**Tabela 6** - Fatores e níveis utilizados no CCD para amostras de plasma.

Fatores	Baixo (-1)	Central	Alto(+1)	$(\alpha=1,682)$	
				$-\alpha$	$+\alpha$
pH da fase doadora	6,5	7,5	8,5	6	9
pH da fase aceptora	10,5	11	11,5	10	12
Tempo de agitação(min)	24	30	36	20	40

**Tabela 7** - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME para amostras de plasma.

Experimento	A	B	E
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

### 3.12 Seleção da condição ótima de extração para amostras de saliva

Um CCD foi empregado para avaliar a condição ótima de extração. Os fatores pH da fase doadora, pH da fase aceptora, força iônica e tempo de agitação foram incluídos no CCD para otimização das respostas máximas do TPM pelo método de extração por HF-LPME três fases. A velocidade de agitação foi fixada a 1000 rpm.

O CCD  $2^4$  (2 níveis com 4 fatores) foi realizado com 6 corridas axiais (pontos estrela) e 3 pontos centrais totalizando 27 experimentos ( $2^4 + (2 \times 4) + 3 = 27$ ) realizados em triplicata ( $n = 81$ ). O valor de  $\alpha$  foi 2 para estabelecer a condição de rotabilidade. Os fatores e níveis deste planejamento estão dispostos na Tabela 8, e os experimentos gerados na Tabela 9. A recuperação do TPM foi utilizada como resposta e os resultados foram avaliados pelo software estatístico *Minitab* 18.0.

**Tabela 8** - Fatores e níveis utilizados no CCD para amostras de saliva.

Fatores	Baixo (-1)	Central	Alto (+1)	$(\alpha=2)$	
				$-\alpha$	$+\alpha$
pH da fase doadora	6,5	7,5	8,5	6,0	9,0
pH da fase aceptora	10,5	11	11,5	10,0	12,0
Força iônica (%)	1,0	1,5	2,0	0,5	2,5
Tempode agitação (min)	24	30	36	20	40

**Tabela 9** - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME para amostras de saliva.

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>E</b>
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Pelos resultados apresentados nos ensaios de linearidade e efeito matriz na etapa de validação analítica pode-se observar que houve interferência do sal com os componentes endógenos da saliva na resposta esperada para o TPM. Desta forma, os experimentos do CCD foram analisados novamente sem incluir o fator força iônica para otimização das respostas máximas do TPM. Os fatores e níveis deste planejamento (2 níveis e 3 fatores) e os experimentos gerados são os mesmos

dispostos na Tabelas 6 e 7, respectivamente, totalizando 17 experimentos ( $2^3 + (2 \times 3) + 3 = 17$ ) realizados em triplicata ( $n = 51$ ).

Após a realização do CDD para amostras de plasma e saliva, gráficos de superfície de resposta foram construídos para os fatores que exerceram efeito sobre a recuperação do TPM. Para a determinação da condição de máxima recuperação foi utilizada a função desejabilidade, tendo como objetivo maximizar a resposta.

O programa *Statistica*<sup>®</sup> foi utilizado para analisar os dados do delineamento e para gerar os dados de superfície de resposta.

### 3.13 Validação do método analítico

Uma vez que o método bioanalítico é desenvolvido, a validação é conduzida para provar que este pode ser utilizado e gerar resultados confiáveis que possam ser empregados na rotina para a aplicação pretendida (ROZET et al., 2011).

Após a otimização dos parâmetros para extração do TPM por HF-LPME para amostras de plasma e saliva, foi realizada a validação para os métodos desenvolvidos contemplando os seguintes parâmetros: efeito matriz, linearidade (curva de calibração analítica), limite de quantificação, seletividade, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade (congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração e pós- processamento) (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

#### 3.13.1 Efeito matriz

O efeito matriz corresponde ao efeito dos componentes da matriz biológica na resposta do analito (ANVISA, 2012). O efeito matriz foi determinado pela análise de amostras de matrizes biológicas processadas (brancos), posteriormente adicionadas de concentrações definidas do TPM. Para amostras de plasma foram avaliados 8 amostras de plasma nas concentrações referentes ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e ao controle de qualidade de alta concentração (CQA), sendo: 4 plasmas normais, 2 plasmas lipêmicos e 2 plasmas hemolisados para cada concentração referente. No caso da saliva, foram testadas 6 amostras de fonte distintas nas concentrações referentes ao CQB e CQA. Essas amostras foram

comparadas com as respectivas soluções padrão preparadas em metanol, utilizando o Fator Matriz Normalizada (FMN), calculado segundo a equação 3:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução}} \quad (\text{Equação 3})$$

O Coeficiente de variação entre todos os FMN não pode ser superior a 15% (ANVISA, 2012).

### 3.13.2 Linearidade

A linearidade corresponde a resposta do equipamento em relação à concentração do analito na amostra em estudo (ANVISA, 2012). As curvas de calibração analítica foram construídas contendo seis níveis nas concentrações plasmáticas e salivares de 1 (LIQ, limite inferior de quantificação); 5 (CQB, controle de qualidade de concentração baixa); 10; 15 (CQM, controle de qualidade de concentração média); 20 (CQA, controle de qualidade de concentração alta) e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (LSQ, limite superior de quantificação), realizadas em quintuplicata (n=5).

Os gráficos de calibração foram construídos com os valores de concentração plasmática e de saliva do TPM no eixo das abcissas, e a área do TPM no eixo das ordenadas. Foi feita a análise estatística dos dados através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação. A adequação do modelo foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, com os cálculos dos valores de F e p, para um nível de confiança de 95%, pelo programa *Minitab* 18.0.

### 3.13.3 LIQ, precisão e exatidão

O LIQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão com desvios abaixo de 20% (ANVISA, 2012). Para a determinação do LIQ foram realizadas análises de cinco amostras de plasma/saliva submetidas ao procedimento de extração, o LIQ foi calculado baseado na curva de calibração analítica e os resultados foram avaliados através de cálculos de precisão e exatidão.

A precisão é definida como a proximidade de resultados obtidos repetidamente e é expressa pelo coeficiente de variação (CV%). Como valores de referência não se admitem variações superiores a 15%, exceto para o LIQ, onde se admite valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2012).

A exatidão é definida como a concordância de um resultado obtido com o valor de referência e é expressa pelo erro relativo (EPR%), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal.

O CV% e o EPR% foram calculados de acordo com as equações 4 e 5 a seguir:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CME} \text{ (Equação 4)}$$

Em que o CV é o coeficiente de variação, DP é o desvio padrão e CME, a concentração média experimental (ANVISA, 2012).

$$EPR (\%) = \frac{(CME - Valor\ nominal) \times 100}{Valor\ nominal} \text{ (Equação 5)}$$

A precisão e exatidão foram determinadas em quintuplicata e em cinco níveis de concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA E LSQ. As determinações foram realizadas em um mesmo dia (precisão intracorrída) e em três dias diferentes (precisão intercorrídas).

#### 3.13.4 Seletividade

A seletividade pode ser definida como a capacidade que o método possui de analisar exatamente um composto em presença de outros componentes (ANVISA, 2012). Após a realização dos procedimentos de extração propostos, a seletividade para amostras de plasma foi avaliada pela análise de seis fontes diferentes de amostra branco, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Para a saliva foram analisadas 6 amostras de fontes distintas.



Como critério de aceitação, tem-se que as respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do limite inferior de quantificação do método (LIQ) (ANVISA, 2012).

### 3.13.5 Efeito residual

O efeito residual também conhecido como *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (ANVISA, 2012).

Assim, após a extração, o efeito residual foi avaliado pela análise da amostra de plasma/saliva branco, seguida pela análise da amostra correspondente ao LSQ e de duas amostras de plasma/saliva branco.

Para a comprovação da ausência do efeito residual, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ (ANVISA, 2012).

### 3.13.6 Estabilidade

Um dos principais problemas relativos às amostras biológicas é a instabilidade dos fármacos, por isso monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com o preparo, a análise e as condições de armazenamento da amostra.

A estabilidade foi realizada fortificando-se o plasma e a saliva com TPM nas concentrações referentes ao CQB e CQA (n=3) e submetidas às diferentes condições avaliadas no teste. As condições avaliadas foram:

- Estabilidade pós-processamento (autoinjeter): as amostras de plasma/saliva foram fortificadas com TPM e submetidas aos procedimentos de extração, as amostras foram mantidas no autoinjeter a temperatura ambiente e foram reanalisadas ao final da corrida analítica.

- Estabilidade de curta duração: as amostras de plasma/saliva foram fortificadas com TPM e mantidas à temperatura ambiente por tempo superior ao que as amostras em estudo foram submetidas durante o procedimento de extração (4 horas) e em seguida foram realizados os procedimentos de extração.

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras de plasma/saliva fortificadas com TPM foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 12 horas e depois descongeladas à temperatura ambiente, e congeladas novamente. Depois de 3 ciclos de congelamento/descongelamento as amostras foram submetidas ao procedimento de extração. O número de ciclos de congelamento e descongelamento é determinado de acordo com o número de ciclos as quais serão submetidas as amostras em estudo.

- Estabilidade de longa duração: as amostras de plasma fortificadas com TPM foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 28 dias e então submetidas aos procedimentos de extração. As amostras de saliva fortificadas com TPM foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 14 dias. Esse tempo excede o intervalo de tempo em que as amostras dos pacientes ficaram armazenadas para posterior análise.

Todas as amostras submetidas ao teste de estabilidade ( $n=3$ ) foram quantificadas com o auxílio de uma curva de calibração analítica no intervalo de concentração plasmática de  $1 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e calculados o CV% e o EPR%.

São consideradas amostras estáveis quando não forem observadas concentrações com desvios superiores a 15% quando comparadas a amostras recém preparadas (ANVISA, 2012).

Além da estabilidade do analito em matriz biológica, deve ser demonstrada a estabilidade do analito em solução. A estabilidade do TPM em solução metanólica foi avaliada em triplicata. Foram empregadas amostras recém-preparadas e amostras preparadas há quatro meses, nas concentrações de TPM equivalentes ao CQB e CQA. Assim,  $50 \mu\text{L}$  da solução padrão de TPM, nas condições acima citadas (recém-preparadas e armazenadas há quatro meses), foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, o volume foi completado com fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v) e realizada a análise por LC-MS/MS. Para quantificação destas amostras foi utilizada uma curva de calibração analítica, recém-preparada, utilizando as soluções de TPM nas concentrações metanólicas de 10, 50, 100, 150, 200, e  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O CV% e o EPR% foram calculados.

### **3.14 Aplicação do método**

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em amostras de plasma e saliva de pacientes (n=3) em tratamento com o TPM e atendidos pelo HCFMRP/USP. O intervalo entre as coletas das amostras de plasma para as amostras de saliva foi de 3 meses. As amostras dos pacientes foram armazenadas a -20°C até o momento de uso e posteriormente foram descongeladas e centrifugadas a 2300 x g por 15 minutos, a 4 °C como etapa prévia à extração. A determinação da concentração plasmática e salivar de TPM foram realizadas baseadas em uma curva de calibração recém-preparada no intervalo de concentração de 1 – 30 µg mL<sup>-1</sup>.

## Resultados e Discussão

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação das condições analíticas por LC-MS/MS

Inicialmente, as condições de monitoramento dos compostos de interesse no espectrômetro de massas foram avaliadas pela infusão direta do TPM e PRE no analisador de massas.

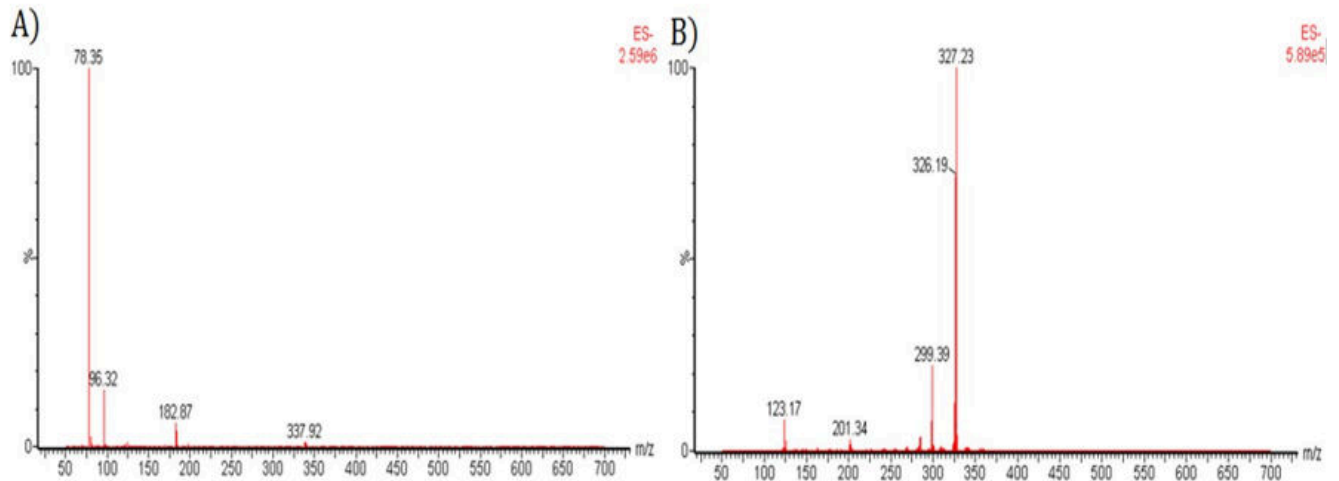
Foram avaliados os modos negativo e positivo de ionização a fim de avaliar a melhor condição de ionização dos analitos, ou seja, se eles apresentam uma maior tendência de ganhar ou perder prótons durante o processo de ionização.

A avaliação dos parâmetros de análise por MRM foi realizada para a obtenção dos íons produtos mais estáveis dos analitos. Desta forma, para cada íon molecular foi definido o íon produto que apresentasse maior abundância relativa. Para isso os íons precursores foram fragmentados na cela de colisão com gás argônio associado à energia de colisão específica para geração dos íons produtos. As transições de íons avaliadas para o modo negativo e positivo de ionização estão dispostas na Tabela 10. As Figuras 6, 7 e 8 mostram os íons produtos de maior intensidade, extraídos do espectro MS/MS.

**Tabela 10** - Transições de íons avaliadas para o modo negativo e positivo de ionização de TPM e PI.

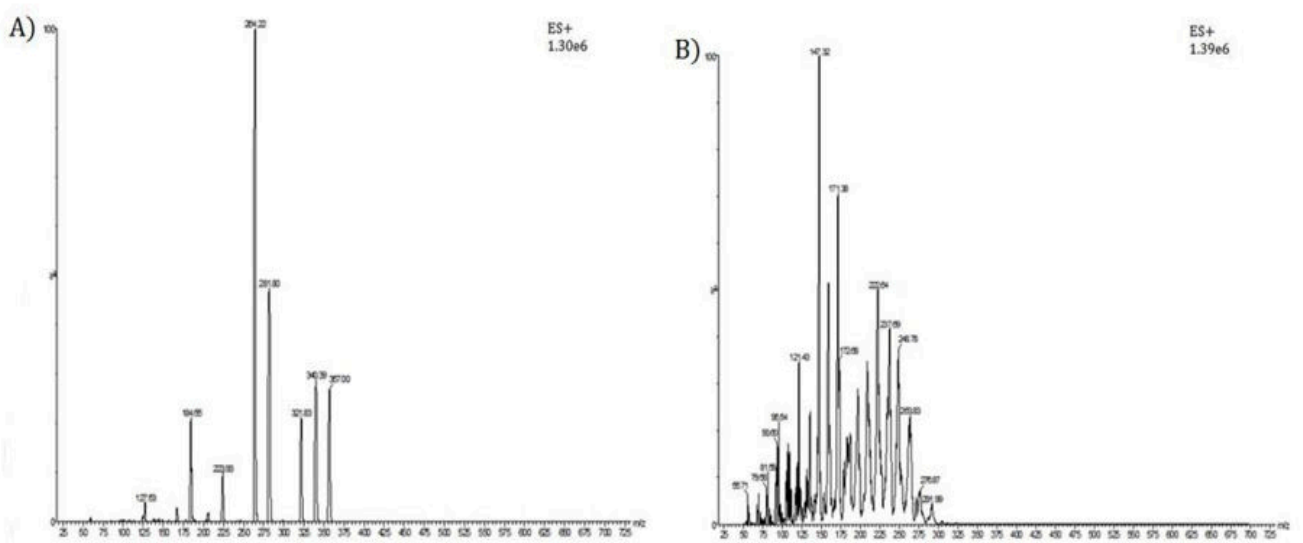
Modo de ionização	Quantificação (m/z)		Qualificação (m/z)	
	TPM	PRE	TPM	PRE
<b>ESI-</b>	337.9 → 78.3	357.0 → 327.2	337.9 → 96.3	357.0 → 123.1
<b>ESI+</b>	357.7 → 264.2	359.0 → 147.5	357.7 → 184.3	359.0 → 123.3

**Figura 6** - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em solução de acetonitrila:água (80:20 v/v) no modo negativo de ionização.



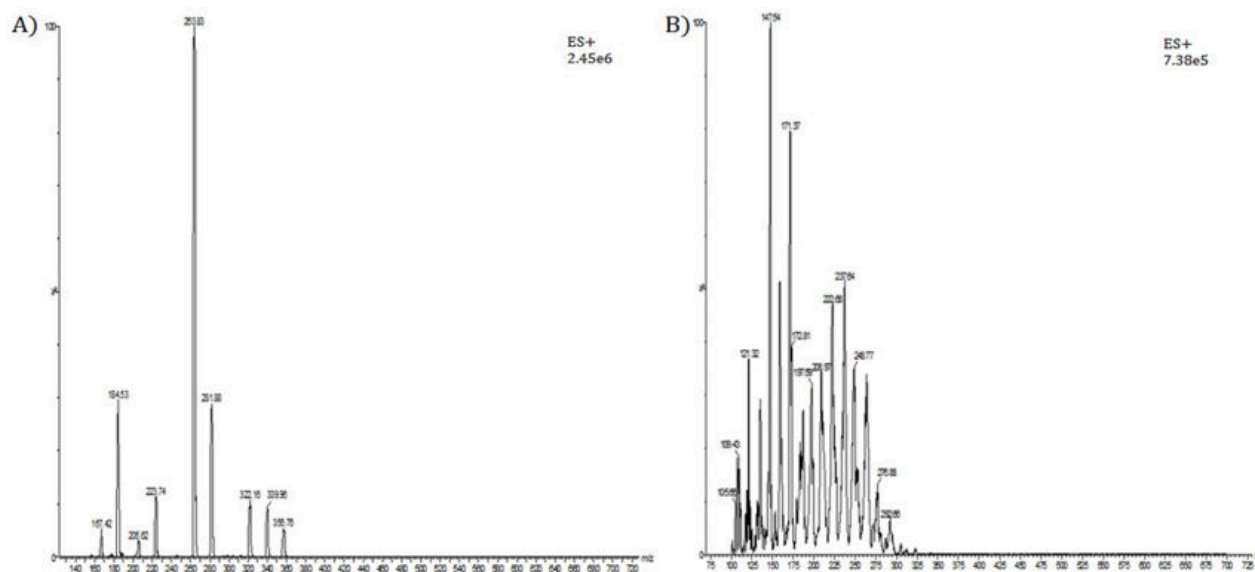
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

**Figura 7** - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em solução de acetato de amônio  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo 0,1% de ácido fórmico em metanol no modo positivo de ionização.



Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

**Figura 8** - Espectro MS/MS (íons produtos) dos padrões de A) TPM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) PRE ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila:tampão acetato de amônio pH 6.3 (55:45 v/v) no modo positivo de ionização.



Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

De acordo com a literatura, a análise do TPM no modo negativo de ionização apresenta melhores resultados do que no modo positivo (KIM et al., 2011; SUBRAMANIAN; BIRNBAUM; REMMEL, 2008). Neste trabalho também foi observada melhor ionização no modo negativo.

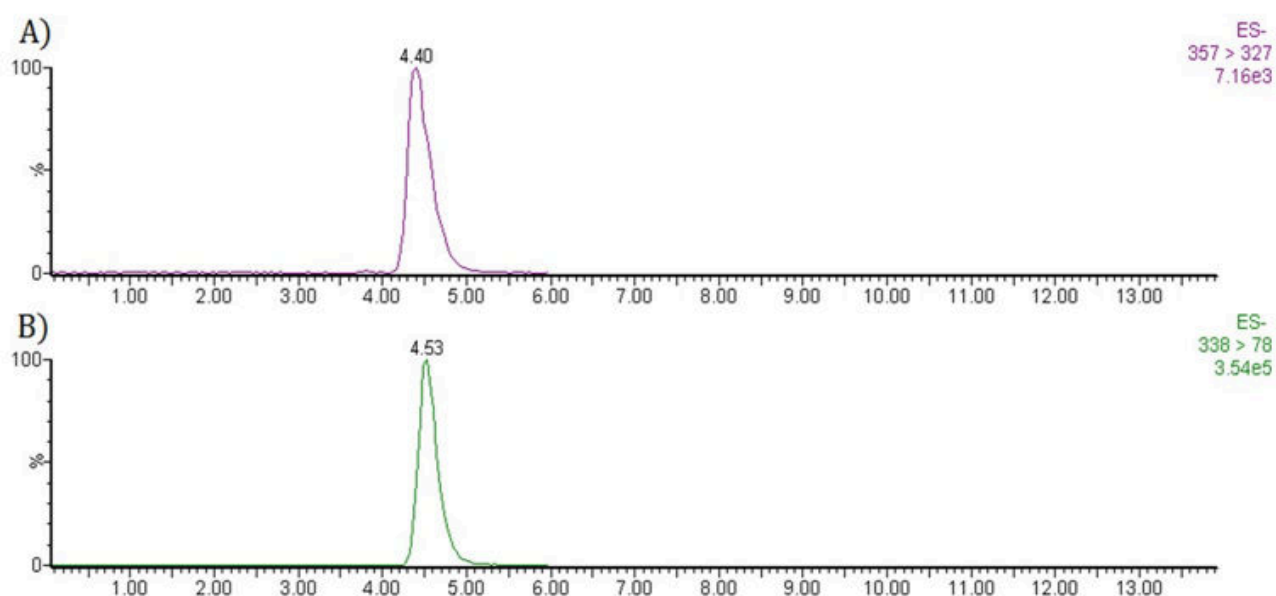
A acetonitrila que também compõe a fase móvel atua como agente facilitador do processo de ionização em fonte de ionização do tipo ESI. Nessas fontes o solvente orgânico apresenta baixa tensão superficial, alta volatilidade e menor eficiência de solvatação dos íons, facilitando o processo de ionização dos analitos e proporcionando aumento na sensibilidade (CASS; CASSIANO, 2015). Quanto à polaridade, os solventes preferidos para serem empregados na ionização por ESI são os solventes polares ou de média polaridade, uma vez que estes favorecem a estabilização de íons em solução (CASS; CASSIANO, 2015), por isso a combinação de água é utilizada.

Ainda, as condições de ionização no modo negativo mostraram íons produtos mais estáveis para a PRE do que no modo positivo. O uso da PRE como PI também foi observado em outros trabalhos (KIM et al., 2011; SUBRAMANIAN; BIRNBAUM; REMMEL, 2008). Assim, o modo negativo foi o modo de ionização mais adequado para avaliação dos analitos. Os parâmetros otimizados para o modo selecionado estão descritos na Tabela 11.

**Tabela 11** - Condições do espectrômetro de massas para análise do TPM e da PRE por LC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Fonte de Ionização	<i>Electrospray</i> no modo negativo
Voltagem do capilar (kV)	3,50
Voltagem do cone (V)	TPM 40 PRE 25
Energia de colisão (eV)	TPM 35 PRE 20
Tensão do extrator (V)	2
Temperatura de fonte de ionização (°C)	100
Temperatura de dessolvatação (°C)	350

Posteriormente, as condições cromatográficas foram ajustadas com a finalidade de maximizar a detectabilidade do sinal analítico. Para tanto, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18, fase móvel composta por acetonitrila: água (80:20 v/v), na vazão de 250  $\mu\text{L min}^{-1}$  e temperatura de 40°C (MATAR, 2010; PARK et al.; 2008). O tempo de análise foi inferior a 6 minutos. Os cromatogramas do método proposto podem ser observados na Figura 9.

**Figura 9** - Cromatogramas referentes aos padrões de A) PRE (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e B) TPM (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água (80:20 v/v); vazão de 0,25  $\text{mL min}^{-1}$ .

Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

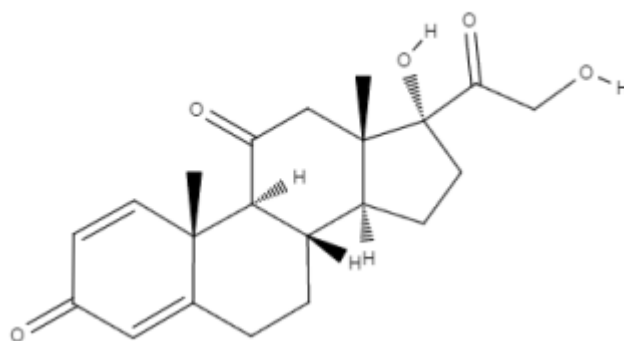


## 4.2 Seleção do Padrão Interno

Para melhorar a precisão, corrigir erros por variações de volumes de injeção, variações instrumentais e perdas relacionadas à evaporação do solvente e por manipulações da amostra foi avaliada a adição de PI (CASSIANO et al., 2009).

Para isso, a substância usada como PI deve ser similar ao TPM em relação às suas características físico-químicas e não fazer parte da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Desta forma, assim como em outros trabalhos a PRE (Figura 10) foi selecionada para essa finalidade e foi observada sua capacidade de permanecer em sua forma não ionizada no mesmo intervalo de pH que o TPM, visto que esta condição contribui para a recuperação dos analitos (CHEN; CARVEY et al., 2001; GOSWAMI et al., 2009; PARK et al., 2008; PEDRAZZOLI JUNIOR et al., 2014).

**Figura 10** - Estrutura química da PRE.



Fonte: Elaborada pelo autor, com base em ZANETTE (2018).

A concentração de PRE adicionada nas amostras de plasma foi definida de forma a gerar um sinal compatível com o sinal gerado na análise da concentração de quantificação média do TPM, para que assim pudesse normalizar tanto as concentrações mais baixas quanto mais altas da curva analítica. Nos testes iniciais de desenvolvimento se observou que em amostras analisadas em plasma o sinal da PRE era cerca de 50% menor que o sinal do mesmo composto em solução. Assim, optou-se por aumentar a concentração utilizada de PI nas análises realizadas em plasma, afim de que pudesse normalizar de maneira correta a concentração dos íons de maior concentração e intensidade. Foi então utilizada uma concentração de PRE de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  nas análises realizadas.

Posteriormente, pelos resultados apresentados nos ensaios da etapa de validação analítica, os parâmetros de desempenho analítico apresentaram melhores resultados de precisão e exatidão quando realizados sem a adição de PI. Desta forma, optou-se por não utilizar a adição de PI nas análises de validação realizadas em plasma e saliva. De acordo com o guia oficial (ANVISA, 2012), a não utilização do PI pode acontecer desde que justificada. Acredita-se que esta dificuldade também foi encontrada em outros estudos que fizeram uso da HF-LPME, onde também não foi citado o uso de PI (EBRAHIMZADEH et al., 2011; ESRAFILI et al., 2012; ZARGAR, PARHAM; HATAMIE, 2016).

### **4.3 Avaliação da HF-LPME para análise do TPM em plasma e saliva**

Após a avaliação das condições para análise do TPM por LC-MS/MS, a HF-LPME foi otimizada no modo de 3 fases. A HF-LPME foi selecionada por oferecer o desenvolvimento de procedimentos menos prejudiciais ao meio ambiente, com o uso de uma quantidade mínima de solvente (em torno de 50 µL). Além disso, o sistema de três fases utilizado possui fase acceptora compatível com o sistema analítico empregado (LEE et al., 2008).

#### **4.3.1 Efeito da impregnação do solvente orgânico na fibra por HF-LPME três fases**

Primeiramente, para alcançar os melhores valores de recuperação do analito de interesse, o parâmetro solvente orgânico foi estudado (CHA; MYUNG, 2013; EBRAHIMZADEH et al., 2010; SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011).

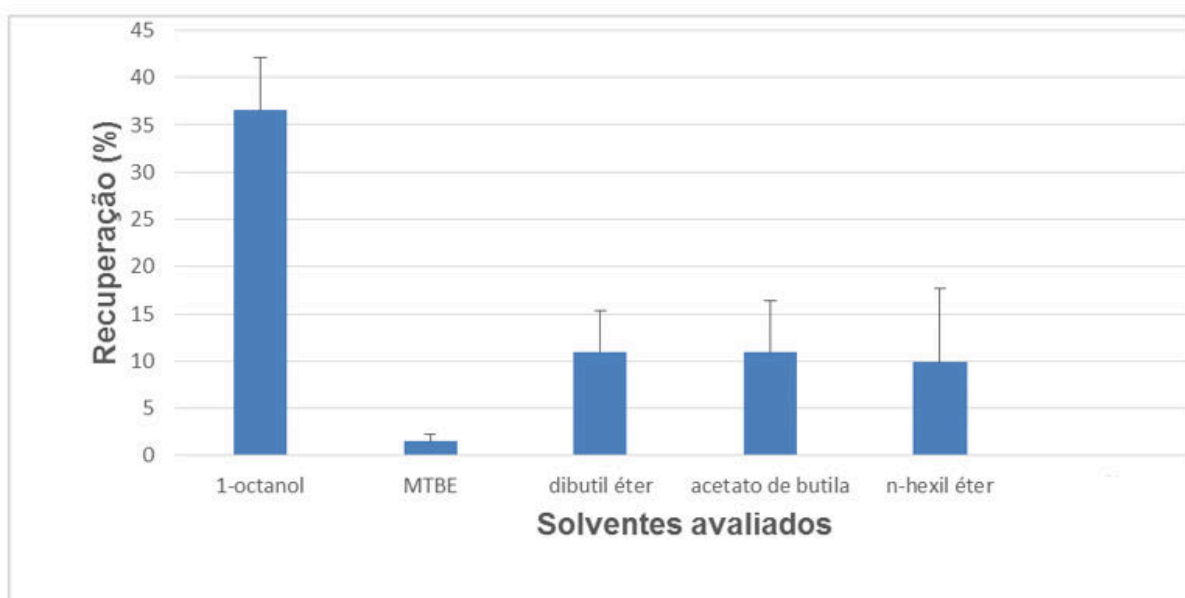
Conforme descrito no *item* 3.10.1, a fase aquosa (doadora) foi composta por 200 µL de plasma branco adicionado do TPM e PI, e 3,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> para manter o pH da amostra constante e o fármaco na sua forma não-ionizada. Entretanto, a fase acceptora deve estar em pH que permita a ionização do composto a ser extraído (HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012).

Uma etapa crucial na otimização do método para a HF-LPME é a seleção do solvente de extração (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). O solvente orgânico se encontra imobilizado nos poros da fibra. Ele age como uma barreira, entre a fase doadora e a fase acceptora, que o analito precisa atravessar para ser extraído (CHA; MYUNG, 2013). Para isso, é necessário que esse solvente orgânico possua características importantes como: ter baixa volatilidade para evitar sua perda durante

o processo de extração, ser possível sua imobilização nos poros da fibra, ter baixa solubilidade em água (EBRAHIMZADEH et al., 2010), alta solubilidade com os analitos de interesse (CHA; MYUNG, 2013) e apresentar moderada viscosidade para evitar a sua saída dos poros da fibra (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011). Seguindo esses conceitos, os solventes orgânicos testados foram o dibutil éter, 1-octanol, acetato de butila, n-hexil éter, MTBE e clorofórmio.

Como mostrado na Figura 11, o solvente 1-octanol foi o que apresentou maior valor de recuperação do TPM da amostra de plasma (36,5%) e também melhor *clean up* da amostra, sendo possível obter um cromatograma livre de interferentes endógenos. Portanto, este foi o solvente selecionado para impregnação da fibra. Não foi possível utilizar o clorofórmio para extração do TPM, pois este solvente dissolveu a fibra no momento da impregnação.

**Figura 11** - Efeito do solvente orgânico na extração do TPM em plasma por HF-LPME. A extração foi realizada por 40 minutos e agitação a 1000 rpm. Comprimento da fibra 13 cm. Fase doadora: 3,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5 e fase aceptora solução concentrada de hidróxido de amônio pH 11,5.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa Excel 2013.

#### 4.3.2 HF-LPME duas fases

A extração utilizando o sistema de duas fases foi avaliada, para isso, foi utilizado o solvente de impregnação que apresentou maior valor de recuperação (1-octanol) na análise do sistema de três fases. Esse tipo de extração, além de

apresentar uma menor recuperação do analito de interesse, sendo obtida uma recuperação de 24%, apresentou uma maior demanda de tempo, uma vez que o tempo para evaporação do 1-octanol se tornou inviável para o procedimento. Além disso, foi necessário centrifugar a fase aceptora para recolher o sobrenadante para posterior análise em LC-MS/MS. Assim, este modo de extração não foi selecionado.

#### **4.4 Otimização do método de extração por HF-LPME três fases**

O planejamento experimental é interessante quando se deseja avaliar a influência de vários fatores em determinado processo, uma vez que fornece informações mais precisas da relação desses fatores entre si, além de objetivar um número reduzido de análises. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade dos resultados, redução do tempo de análise e dos custos envolvidos (FERREIRA et al., 2007a). Os delineamentos ainda são pouco explorados para otimização dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME, porém já existem trabalhos descritos na literatura (EBRAHIMZADEH et al., 2012; EMÍDIO et al., 2010; NCUBE et al., 2016).

Como o número de fatores a serem investigados na otimização do procedimento de extração é grande, optou-se por um planejamento fracionário. Entre os delineamentos, o FFD é o mais popular e permite obter informações úteis através de um número reduzido de experimentos (EBRAHIMZADEH et al., 2011).

##### **4.4.1 FFD em plasma**

Com o intuito de avaliar os parâmetros que pudessem influenciar diretamente no processo de extração, o FFD foi aplicado. Os parâmetros a serem avaliados foram escolhidos da seguinte forma:

pH da doadora: Escolhido para manter os analitos na forma não ionizada contribuindo para que eles tenham uma maior afinidade pelo solvente orgânico.

pH da aceptora: Escolhido para manter os analitos na forma ionizada contribuindo para que eles permaneçam dentro da fibra durante a extração, não retornando para a fase doadora.

Velocidade de agitação: Velocidade que permita alcançar mais rapidamente as condições de equilíbrio (DE OLIVEIRA et al., 2008).

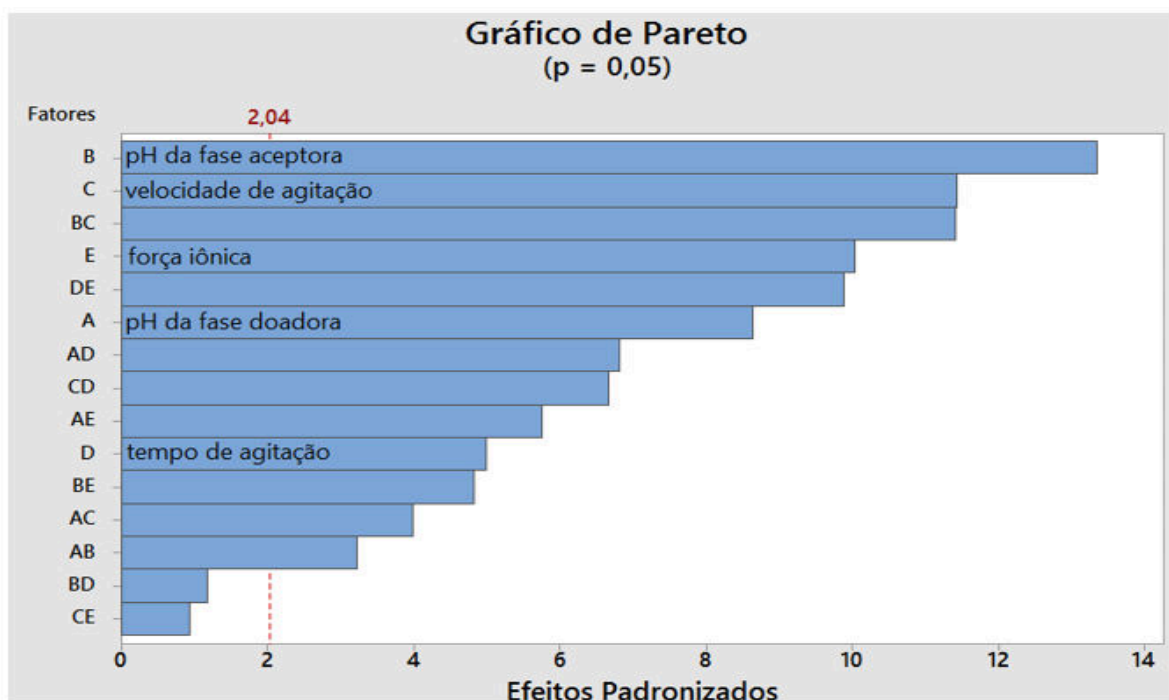
Tempo de agitação: A transferência de massa na HF-LPME é um processo tempo-dependente. Portanto, o aumento do tempo de extração leva a um aumento nas recuperações até atingir um platô (BAHRAMI et al., 2017; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Força iônica: a adição de sal pode diminuir a solubilidade do analito na água e, conseqüentemente, aumentar a extração por causa do efeito *salting-out* (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Foi empregado um FFD de cinco fatores e dois níveis para a avaliação dos parâmetros que influenciam a extração do TPM. Como descrito no item 3.11, os parâmetros selecionados foram: A) pH da fase doadora, B) pH da fase aceptora, C) velocidade de agitação, D) tempo de agitação e E) força iônica (% de NaCl).

O resultado desse estudo foi avaliado pela construção do Gráfico de Pareto (Figura 12) para a triagem das variáveis da HF-LPME para amostras de plasma, utilizando o programa *Minitab*® 18.0.

**Figura 12** - Gráfico de Pareto para o FFD. Avaliação dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do TPM utilizando HF-LPME em plasma. A linha vertical define o nível de confiança de 95%.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Minitab*® 18.0.

A linha vertical do gráfico demonstra se os efeitos são estatisticamente significativos ou não. As barras que se estendem além da linha correspondem aos efeitos que são estatisticamente significativos com um nível de confiança de 95% ( $p=0,05$ ) para melhora da resposta avaliada. O valor do teste t de Student foi inferior a 0,05 para todas condições. O modelo proposto apresentou um valor de  $R^2$  de 99,0%, indicando um bom ajuste dos dados experimentais, onde as variáveis dependentes conseguem ser explicadas pelos valores observados no modelo. Conforme os resultados na figura 12, as variáveis pH da fase doadora, pH da fase acceptora e velocidade de agitação tiveram seus efeitos com valores positivos, ou seja, a resposta (recuperação) aumenta quando uma variável passa do nível menor para o nível maior. As variáveis tempo de agitação e força iônica (% de NaCl) tiveram seus efeitos com valores negativos, ou seja, a resposta diminui quando uma variável passa do nível menor para o nível maior. Dentre os efeitos positivos, o pH da fase acceptora foi o fator mais significativo (maior valor numérico da estatística do teste t de Student) dentre as variáveis estudadas, seguido dos fatores velocidade de agitação e pH da fase doadora. As interações de segunda ordem entre as variáveis pH da fase acceptora e velocidade de agitação também foram altamente significativas.

O pH teve influência importante no aumento da resposta dos analitos, sendo extraídos de forma mais eficiente nas interações com os níveis mais altos (pH 7,5 da fase doadora e pH 11,5 da fase acceptora). Essa influência corrobora com o ajuste do pH para proporcionar meio mais ácido, onde o composto possa permanecer em sua forma não ionizada na fase doadora e meio mais básico onde o composto possa permanecer na sua forma ionizada na fase acceptora. O efeito positivo da velocidade de agitação favoreceu o rendimento da extração do TPM, porém verificou-se que uma velocidade de agitação acima de 1000 rpm não sustenta uma boa agitação dos tubos, assim como, promoveu evaporação do solvente. Agitações muito vigorosas podem produzir bolhas de ar na superfície da fibra (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007) e também promover o deslocamento do solvente orgânico dos poros (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011).

Pode-se observar também que o efeito negativo dos fatores, tempo de agitação e força iônica diminuem as respostas. O efeito negativo do sal pode ser justificado devido a uma possível alteração das propriedades físico-químicas da amostra, como a tensão superficial e viscosidade (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Além disso, o efeito negativo do tempo de extração

pode estar relacionado à condição de equilíbrio já ter sido atingida no nível baixo do tempo de agitação. Desoubries et al., (2012) explicam que devido ao formato e tamanho reduzidos do tubo onde está a amostra (tubo de 6 mL), a movimentação do analito e sua rápida transferência para o interior da fibra é facilitada. É relatado na literatura tempos de agitação relativamente longos para esta extração, que variam entre 30 e 50 minutos (CARRÃO et al., 2011; CHA; MYUNG, 2013; EBRAHIMZADEH et al., 2010; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011).

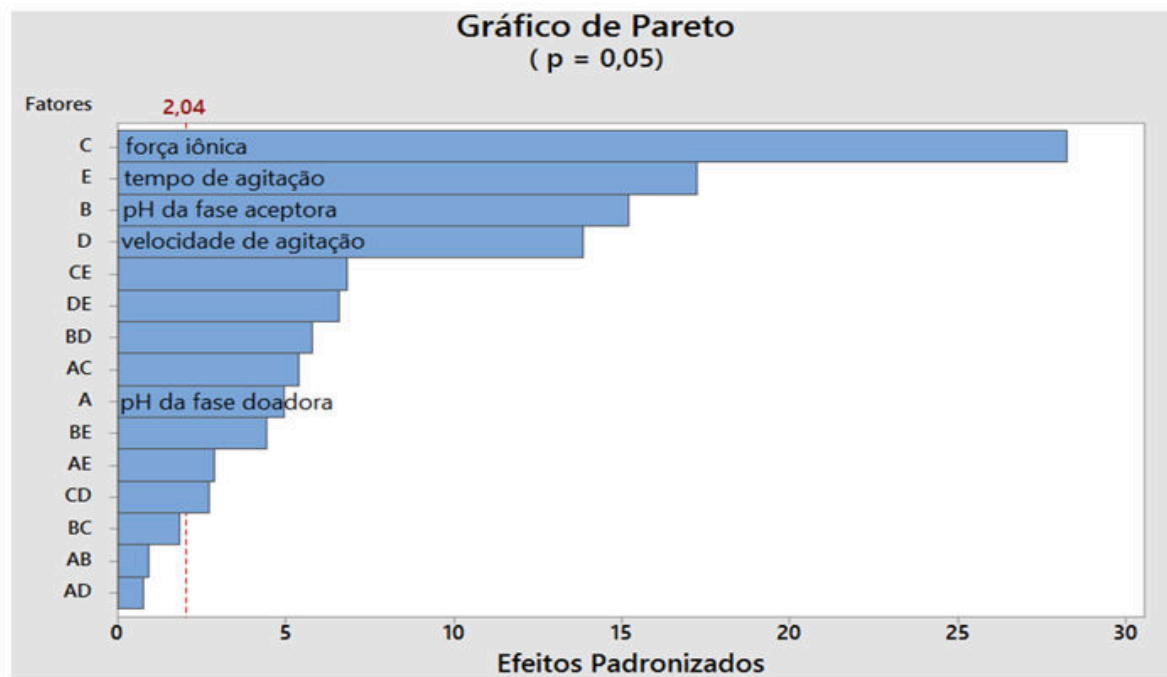
Como na maioria dos casos, nesta primeira triagem não é necessária a investigação de interações entre os fatores, mas sim determinar quais os fatores que tem uma grande influência nos resultados para que esses possam ser melhor estudados (LUNDSTEDT et al., 1998). Com base nos parâmetros avaliados, as variáveis pH da fase doadora, pH da fase aceptora e tempo de agitação foram incluídas no estudo do CCD para otimização das respostas máximas do TPM pelo método proposto para amostras de plasma, conforme os experimentos mostrados na Tabela 7.

#### 4.4.2 FFD em saliva

Foi empregado um FFD de cinco fatores e dois níveis para a avaliação dos parâmetros que influenciam a extração do TPM. Como descrito no item 3.11, os parâmetros selecionados foram: A) pH da fase doadora, B) pH da fase aceptora, C) velocidade de agitação, D) tempo de agitação e E) força iônica (% de NaCl).

O resultado desse estudo foi avaliado pela construção do Gráfico de Pareto (Figura 13) para a triagem das variáveis da HF-LPME para amostras de saliva, utilizando o programa *Minitab*<sup>®</sup> 18.0.

**Figura 13** - Gráfico de Pareto para o FFD. Avaliação dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do TPM utilizando HF-LPME em saliva. A linha vertical define o nível de confiança de 95%.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Minitab*® 18.0.

O valor do teste t de Student foi inferior à 0,05 para todas condições. O modelo proposto consegue explicar cerca de 98,19% da variância indicando um bom ajuste dos dados experimentais.

Conforme os resultados apresentados, todas as variáveis tiveram seus efeitos com valores positivos. Dentre os efeitos positivos, a força iônica foi o fator mais significativo dentre as variáveis estudadas, seguido dos fatores tempo de agitação e pH da fase doadora. Assim como no plasma, o pH na amostra de saliva teve influência importante no aumento da resposta dos analitos, sendo extraídos de forma mais eficiente nas interações com os níveis mais altos (pH 7,5 da fase doadora e pH 11,5 da fase aceptora), o efeito positivo da velocidade de agitação favorece o rendimento da extração do TPM, porém pelos mesmos motivos citados acima, velocidades acima de 1000 rpm não sustentam uma boa extração. Observa-se que o efeito positivo da força iônica sobre a recuperação pode ser justificado devido ao efeito *salting-out*, como também foi realizado em outros trabalhos encontrados na literatura (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; PAYÁN et al., 2011). O efeito do tempo de extração não atingiu a condição de equilíbrio até o tempo de 40 minutos, o que pode estar relacionado com o maior poro e formato da



fibra e também com o maior formato e tamanho do tubo onde está a amostra na técnica HF-LPME tipo “haste” quando comparados ao tubo utilizado na HF-LPME tipo “U”.

A saliva contém vários dos analitos presentes no plasma, porém sua composição apresenta adição de pequenas quantidades de proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e lipídios (DROBITCH; SVENSSON, 1992). O pH plasmático é mantido em cerca de 7,4 e o pH da saliva varia entre 6,2 e 7,4, sendo que tem uma importante correlação com as taxas de fluxo de produção: pH mais elevado está relacionado a uma taxa de fluxo mais elevada (DROBITCH; SVENSSON, 1992). Quando comparado com o plasma o pH da saliva geralmente é menor (CHOO; HUESTIS, 2004), mas como mencionado anteriormente, o pH da fase doadora é otimizado com solução tampão para favorecer a extração dos analitos.

Com base nos parâmetros avaliados, pH da fase doadora, pH da fase aceptora, força iônica e tempo de agitação para amostras de saliva, conforme os experimentos mostrados na Tabela 9.

#### **4.5 Seleção da condição ótima de extração para amostras de plasma**

Nesta etapa, as variáveis pH da fase doadora, pH da fase aceptora e tempo de agitação foram avaliadas em cinco níveis de concentrações ( $-\alpha$ , -1, 0, +1 e  $+\alpha$ ). O estudo envolveu o uso de 17 experimentos, realizados em triplicata, sendo três condições referentes ao ponto central (análises de 15 a 17). O uso de apenas três variáveis no delineamento de segunda ordem, para otimização do processo, foi um critério adotado também por outros estudos descritos na literatura (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009; STALIKAS et al., 2009). Os resultados obtidos nos experimentos estão representados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de plasma.

Experimentos	R (%) ± DP
1	8,1 ± 0,41
2	26,6 ± 1,66
3	29,6 ± 4,62
4	38,3 ± 6,56
5	7,1 ± 0,44
6	16,1 ± 4,31
7	21,5 ± 7,12
8	13,5 ± 0,75
9	11,5 ± 2,66
10	29,8 ± 1,79
11	15,2 ± 1,78
12	25,4 ± 4,23
13	21 ± 4,88
14	5,6 ± 1,92
15	8,9 ± 0,69
16	8,8 ± 4,89
17	8,8 ± 2,25

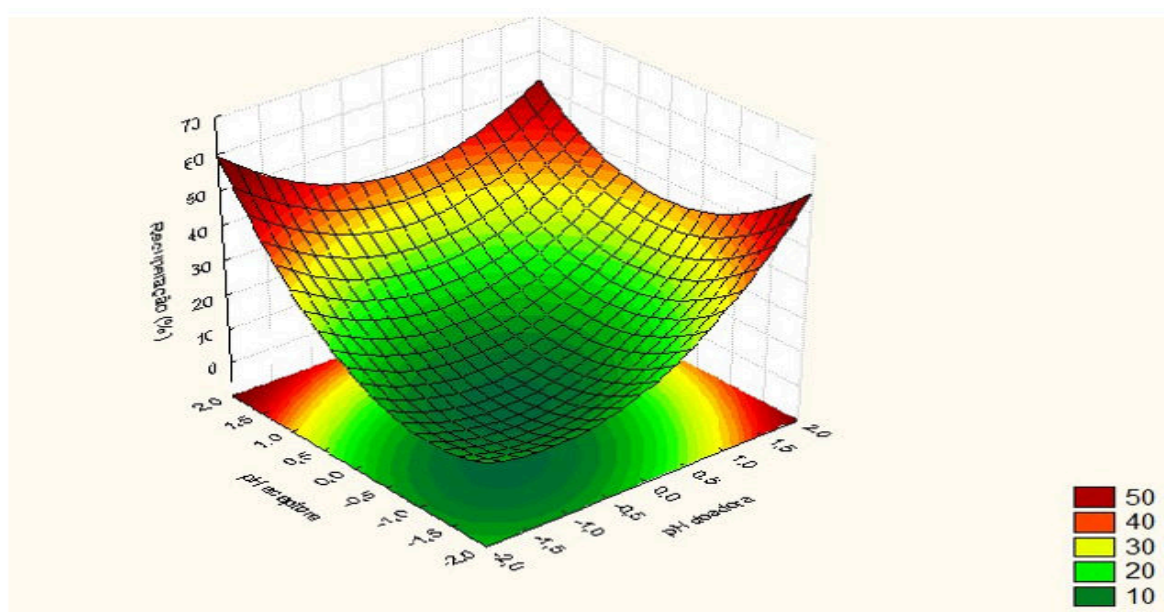
DP-estimativa de desvio padrão absoluto

Os resultados de recuperação das 51 extrações realizadas foram utilizados para a construção de gráficos de superfície de resposta e para delinear as resposta em função das variáveis envolvidas na HF-LPME. Para facilitar a representação do modelo pela equação polinomial, os códigos pH D (pH da doadora), pH A (pH da acceptora) e tempo (tempo de agitação) foram utilizados, sendo obtida a equação: Recuperação do TPM = 8,503 + 4,249 pH D + 5,212 pH A – 5,140 tempo + 4,336 pH D\*pH D + 4,787 pH A\*pH A + 1,834 tempo\*tempo – 3,028 pH D\*pH A – 2,553 pH D\*tempo – 3,166 pH A\*tempo.

O coeficiente de determinação ajustado do modelo foi de 0,8901, o que indica uma boa relação entre os valores experimentais e o modelo. O valor de Fcalc igual a 63,0 foi superior ao Ftab (9;70;0,05) = 2,0, indicando valores significativos para o modelo, por isso, mesmo com um valor de falta de ajuste de 6,0 > Ftab (5;65;0,05) = 2,36, o modelo pode ser utilizado para prever a resposta por meio da equação. E ainda, quando a equação polinomial é utilizada para substituir os valores dos parâmetros selecionados, o

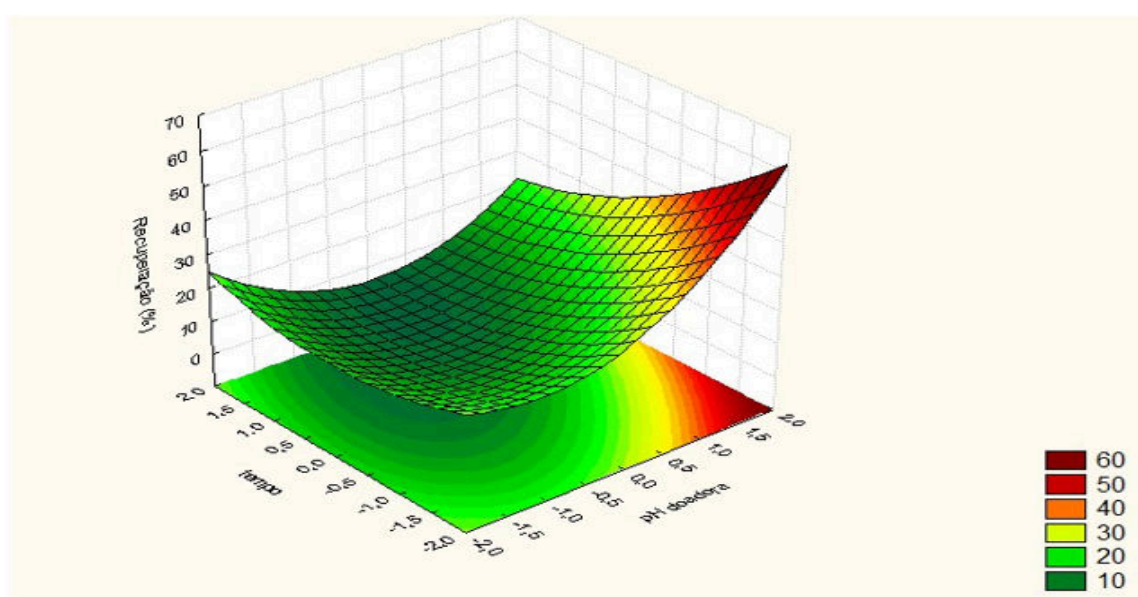
valor de recuperação encontrado prediz o valor experimental, sendo assim possível utilizar o modelo para a predição das respostas. Nas Figuras 14, 15 e 16 estão ilustrados os gráficos de superfície de resposta obtidos para as variáveis avaliadas no CCD sobre a recuperação do TPM em amostras de plasma.

**Figura 14** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e pH da fase aceptora sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.



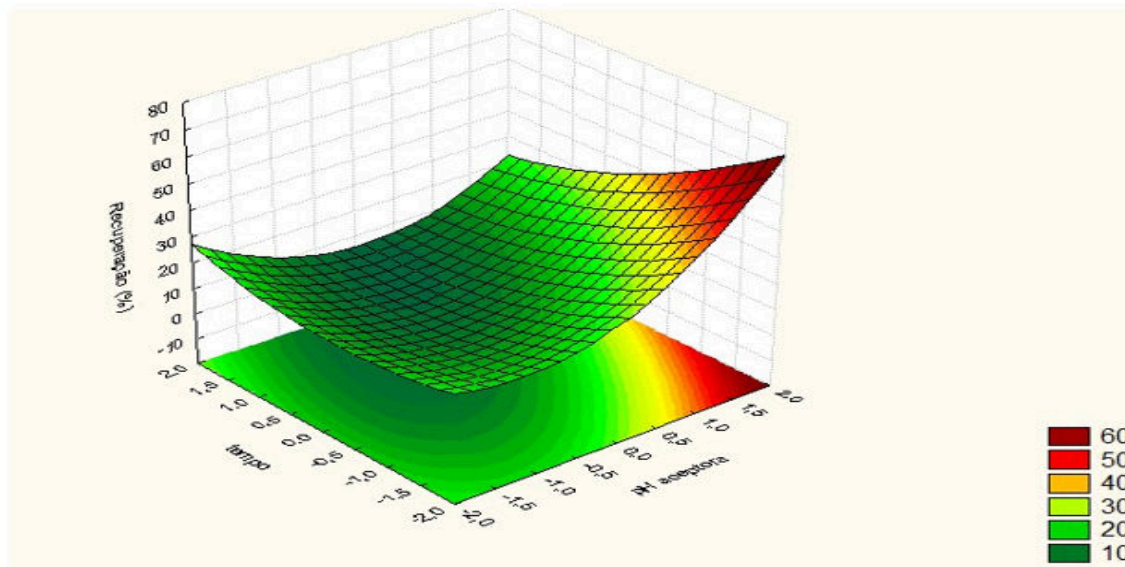
Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Statistica*®.

**Figura 15** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Statistica*®.

**Figura 16** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase aceptora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.

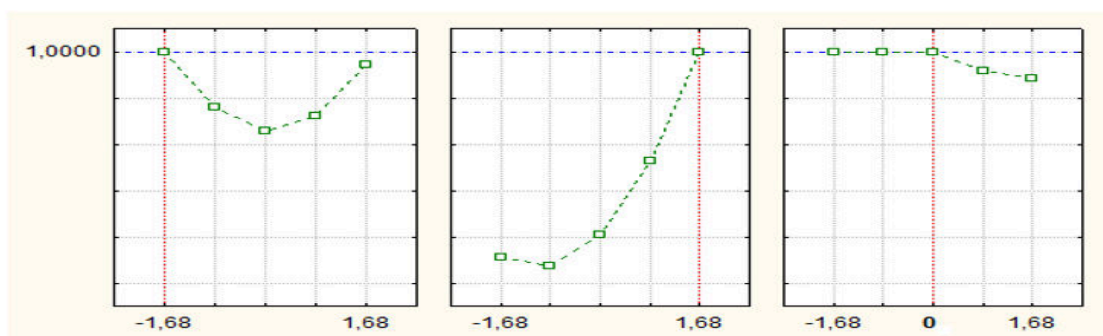


Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Statistica*®.

O teste de desejabilidade foi realizado tendo como objetivo maximizar a recuperação do TPM. Neste teste, valores de desejabilidade próximos a 1 refletem que os valores da variável dependente encontram-se próximos aos valores considerados ótimos pelo experimentador e valores próximos a zero correspondem a situações experimentais não desejáveis (TALEBIANPOOR et al., 2014).

A condição composta pela análise dos níveis (-1,68, 1,68 e 0), correspondentes aos valores de pH da fase doadora 6,0, pH da fase aceptora 12,0 e tempo de agitação de 30 minutos, respectivamente apresentou o valor para recuperação maximizado, sendo de 38,3 % o maior valor de recuperação do TPM encontrada para  $D_{total} = 1$  (Figura 17).

**Figura 17** - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do TPM para HF-LPME em plasma.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa *Statistica*®.

Pode-se observar que o pH das fases apresentou grande influência sobre a recuperação do TPM e promoveu aumento da transferência do TPM para fase acceptora. O pKa do TPM é de 9,7 e sua estrutura apresenta uma característica mais ácida, portanto, a diminuição do pH da fase doadora para 6,0 promoveu aumento da quantidade de TPM na sua forma molecular, facilitando a passagem do TPM para o solvente orgânico presente nos poros da fibra. Para a fase acceptora, um aumento do pH para 12,0 foi necessário para manter o TPM ionizado no interior da fibra.

Para o tempo de agitação, foi constatada que a recuperação permaneceu estável a partir do tempo de 20 minutos até 30 minutos, após esse tempo a recuperação começou a diminuir. Desta forma, optou-se por manter este intervalo de tempo, utilizando o tempo de 30 minutos, pois tempos de extração superiores ao necessário para atingir o equilíbrio podem acarretar em perdas do solvente orgânico presente nos poros da fibra ou da fase acceptora, resultando em diminuição da recuperação (BAHRAMI et al., 2017). Embora este tempo de extração seja relativamente longo quando comparado com o tempo de outras técnicas de extração, é levado em consideração que várias amostras são extraídas simultaneamente, desta forma este parâmetro deixa de ser uma desvantagem para a HF-LPME.

#### **4.6 Seleção da condição ótima de extração para amostras de saliva**

Nesta etapa, os experimentos foram realizados utilizando as variáveis pH da fase doadora, pH da fase acceptora, força iônica e tempo de agitação em cinco níveis de concentração ( $-\alpha$ , -1, 0, +1 e  $+\alpha$ ), na qual o estudo envolveu o uso de 27 experimentos, realizados em triplicata, sendo três condições referentes ao ponto central (análises de 25 a 27).

Porém, como citado anteriormente no item 3.13, foi observada que a influência da força iônica nos resultados apresentados nos ensaios de linearidade e efeito matriz da etapa de validação analítica foi negativa quando houve interferência do sal com os componentes endógenos da saliva na resposta esperada para o TPM. Desta forma, os experimentos do CCD foram analisados novamente sem incluir o fator força iônica, e assim envolveu o uso de mais 17 experimentos, realizados em triplicata, sendo três condições referentes ao ponto central (análises de 15 a 17). Os resultados obtidos nos experimentos estão representados nas Tabelas 13 e 14 para a HF-LPME em amostras de saliva com a adição de sal e sem a adição de sal, respectivamente.

**Tabela 13** - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de saliva com adição de sal na fase doadora.

<b>Experimentos</b>	<b>R (%) <math>\pm</math> DP</b>
1	8,7 $\pm$ 0,60
2	9,0 $\pm$ 0,80
3	10,5 $\pm$ 0,96
4	5,3 $\pm$ 0,36
5	17,1 $\pm$ 0,80
6	10,4 $\pm$ 0,64
7	12,8 $\pm$ 0,40
8	13,5 $\pm$ 0,39
9	6,8 $\pm$ 0,10
10	7,1 $\pm$ 0,35
11	10,1 $\pm$ 0,65
12	3,8 $\pm$ 0,32
13	10,3 $\pm$ 0,56
14	10 $\pm$ 0,49
15	12,3 $\pm$ 0,80
16	5,5 $\pm$ 0,67
17	9,2 $\pm$ 0,67
18	7,0 $\pm$ 0,95
19	9,7 $\pm$ 0,59
20	8,8 $\pm$ 0,77
21	12,9 $\pm$ 0,56
22	13,9 $\pm$ 0,46
23	9,9 $\pm$ 6,77
24	14,9 $\pm$ 0,79
25	15,1 $\pm$ 0,84
26	16,4 $\pm$ 0,65
27	8,7 $\pm$ 0,13

**Tabela 14** - Recuperação média R obtida para o TPM para as análises realizadas no CCD para a HF-LPME em amostras de saliva sem adição de sal na fase doadora.

Experimentos	R (%) ± DP
1	14,4±1,15
2	12,6±0,27
3	18±1,00
4	13,9±0,61
5	15,1±0,86
6	15±0,54
7	21,1±0,85
8	14,4±0,65
9	14,3±1,00
10	10±1,44
11	7,6±0,53
12	8,2±0,87
13	9,7±0,16
14	16,5±0,42
15	13,5±1,30
16	13,5±1,48
17	13,5±7,78

Os resultados de recuperação das 81 extrações realizadas foram utilizados para a construção de gráficos de superfície de resposta e para delinear as respostas em função das variáveis envolvidas na HF-LPME para amostras de saliva, mas como os mesmos não foram utilizados na continuidade do estudo, para facilitar a representação dos dados apresentados, os resultados demonstrados são os 51 experimentos que foram realizados utilizando as variáveis pH da fase doadora, pH da fase aceptora e tempo de agitação. Além disso, a inclusão de um grande número de variáveis na realização do CCD gera um número de experimentos muito elevado e, a partir de três fatores, a superfície de resposta já não pode ser visualizada em sua totalidade (DEJAEGHER; HEYDEN, 2011).

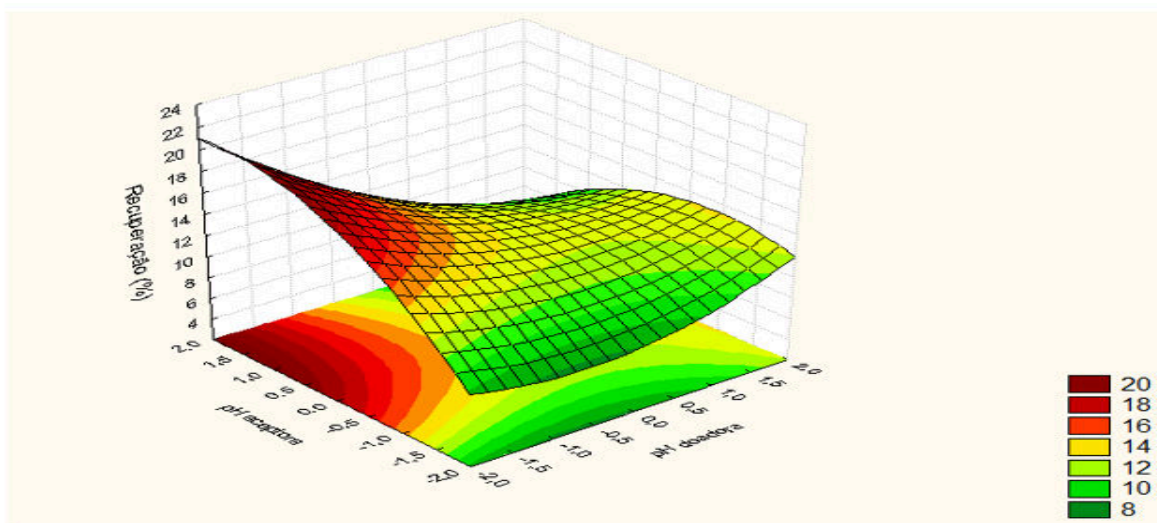
A equação polinomial obtida foi:

Recuperação do TPM = 12,87–1,460 pH D + 0,8226 pH A +1,3127 tempo + 0,668 pH D\*pH D –0,820 pH A\*pH A + 1,007 tempo\*tempo – 1,122 pH D\*pH A – 0,117 pH D\*tempo +0,067 pH A\*tempo.

O coeficiente de determinação ajustado do modelo foi de 0,54, o valor de  $F_{calc}$  igual a 9,16 foi superior ao  $F_{tab}$  ( $9;70;0,05$ ) = 2,0, indicando valores significativos para o modelo, por isso, mesmo com um valor de falta de ajuste de  $56,82 > F_{tab}$  ( $7;31;0,05$ ) = 2,36, o modelo pode ser utilizado para prever a resposta por meio da equação. O valor baixo do coeficiente de determinação ajustado do modelo pode ser explicado pelo desvio dos valores dentro de cada triplicata feita para cada experimento gerado no CCD. Este tipo de delineamento apresenta um ajuste muito fino e a repetição de amostras para cada combinação de fatores ( $n > 3$ ) permite uma melhor estimativa dos erros experimentais, o que ajuda na determinação de um coeficiente com maior valor (HANRAHAN; MONTES; GOMEZ, 2008). Porém, independente desse baixo valor o modelo é significativo e quando a equação polinomial é utilizada para substituir os valores dos parâmetros selecionados, o valor de recuperação encontrado prediz o valor experimental, sendo assim possível utilizar o modelo para a predição das respostas.

Para complementar, tanto nas amostras de plasma quanto nas de saliva, essas pequenas alterações nos resultados entre as triplicatas estão de acordo com as variações permitidas pelo guia oficial (ANVISA, 2012) avaliadas na etapa de validação bioanalítica. Nas Figuras 18, 19 e 20 estão ilustrados os gráficos de superfície de resposta obtidos para as variáveis avaliadas no CCD sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em amostras de saliva.

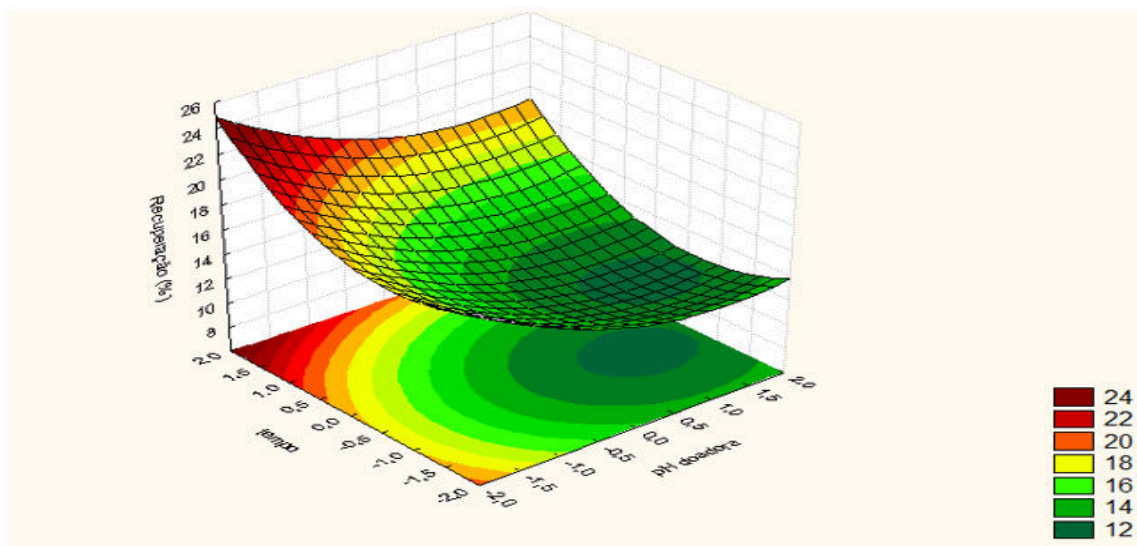
**Figura 18** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e pH da fase aceptora sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

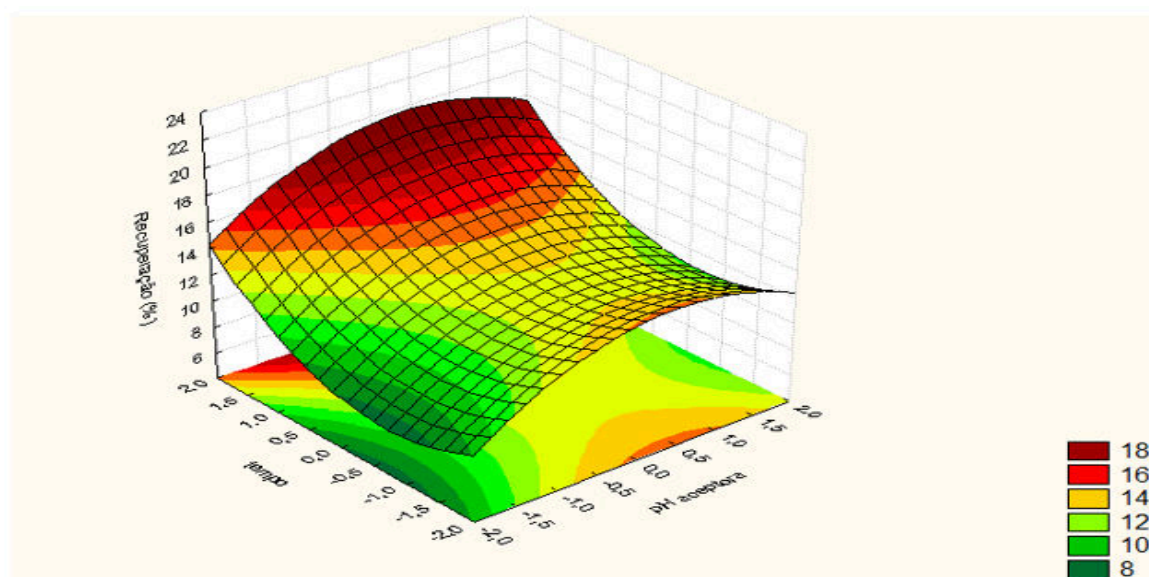


**Figura 19** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase doadora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

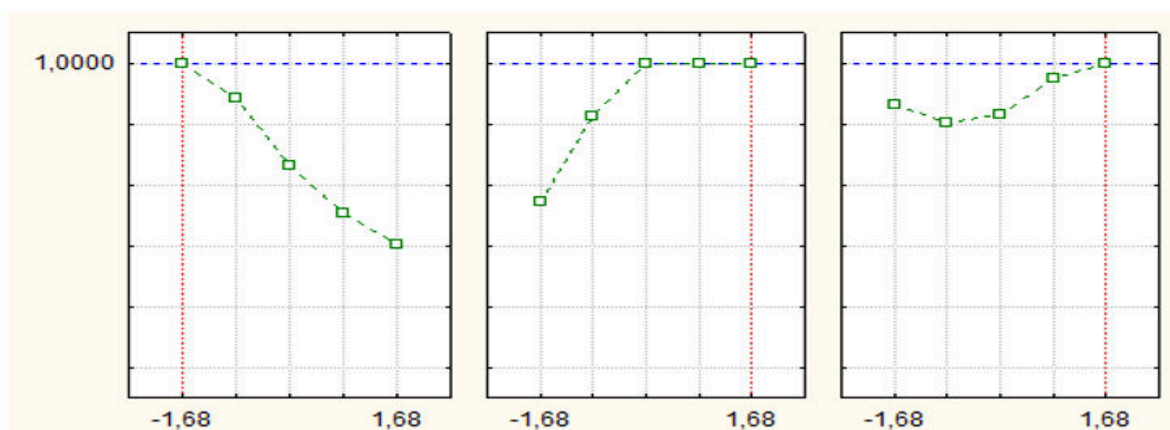
**Figura 20** - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis pH da fase aceptora e tempo de agitação sobre a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

No teste de desejabilidade, a condição composta pela análise dos níveis (-1,68, -1,68 e 1,68) correspondentes aos valores de pH da fase doadora 6,0, pH da fase aceptora 12,0 e tempo de agitação de 40 minutos respectivamente, apresentou o valor para recuperação maximizado, sendo de 21,1 % o maior valor de recuperação do TPM encontrada para  $D_{total} = 1$  (Figura 21).

**Figura 21** - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do TPM para HF-LPME em saliva.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Da mesma forma que para as amostras de plasma, pode-se observar que o pH das fases apresentou grande influência sobre a recuperação do TPM e promoveu aumento da transferência do TPM para fase aceptora.

Para o tempo de agitação, foi constatado que o efeito do tempo de extração não atingiu a condição de equilíbrio até o tempo de 40 minutos, semelhante aos resultados apresentados na fase de triagem do estudo, onde as diferenças entre as técnicas HF-LPME tipo “haste” quando comparadas a HF-LPME tipo “U” são citadas (item 4.3.1).

Ressalta-se que se a técnica de extração assegurar a quantificação necessária do analito, uma alta recuperação do analito não é um fator primordial. Entre as vantagens dos métodos desenvolvidos estão o baixo volume de solvente orgânico utilizado (em torno de 50  $\mu$ L), a agitação simultânea de 36 tubos, sem a necessidade de agitação por barra magnética, a qual pode ser fonte para o efeito “*carry over*” (ALSHARIF ET AL., 2017) e a exclusão da etapa de precipitação das proteínas do plasma por solvente orgânico, recurso utilizado em vários trabalhos os quais utilizam de outras técnicas de extração. As condições para determinação do TPM em amostras de plasma e saliva estão resumidas na Tabela 15.

**Tabela 15** - Condições estabelecidas para as técnicas de HF-LPME em amostras de plasma e saliva.

Condições estabelecidas	Amostras de plasma	Amostras de saliva
Tipo de extração	HF-LPME tipo “U”	HF-LPME tipo “haste”
Volume de amostra	200 µL	700 µL
Solvente para impregnação da fibra	1-octanol	1-octanol
pH fase doadora	6	6
pH fase aceptora	12	12
Velocidade de agitação	1000 rpm	1000 rpm
Tempo de extração	30 min	40 min

## 4.7 Validação do método analítico

### 4.7.1 Efeito Matriz

Por este ensaio garante-se que, mesmo não obtendo altos valores de recuperação, não há nenhum componente da matriz influenciando a análise, dessa forma, o efeito matriz objetivou avaliar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz de plasma e saliva na ionização dos analitos de interesse, podendo provocar diminuição ou ampliação do sinal gerado.

O ensaio foi avaliado pela comparação dos resultados das áreas obtidas com matriz fortificada com aqueles obtidos em solução, nas mesmas concentrações. Foi utilizado o FMN, cujo cálculo foi realizado baseado no guia oficial (ANVISA, 2012), como descrito no item 3.14.1. Os resultados para as amostras de plasma estão dispostos na Tabela 16.

**Tabela 16** - Resultado das análises de Efeito Matriz em oito diferentes lotes de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.

Controle	<sup>a</sup> FMN	<sup>b</sup> CV (%)
CQB	101	2
CQA	91	14

a: Fator da matriz normalizado (Resposta do analito em matriz) / (Resposta do analito em solução padrão) \*100; b: Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100].

Como citado no item 3.13, pode-se observar interferência do sal com os componentes endógenos da saliva quando esse foi adicionado na fase doadora (Tabela 17).

**Tabela 17** - Resultado das análises de Efeito Matriz em seis diferentes fontes de saliva com adição de sal.

Controle	<sup>a</sup> FMN	<sup>b</sup> CV (%)
CQB	185	10
CQA	165	12

a: Fator da matriz normalizado (Resposta do analito em matriz) / (Resposta do analito em solução padrão) \*100; b: Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100].

Pelos resultados apresentados no ensaio de efeito matriz pode se observar que quando a matriz analisada é plasma, a resposta obtida em solução e em matriz é equivalente, não havendo interferência dos componentes endógenos do plasma na resposta esperada para o TPM. Já quando a matriz utilizada para as análises é saliva, observa-se um efeito matriz bastante significativo na saliva que recebeu adição de sal na fase doadora, com influência acima de 50% sobre a resposta esperada. Este fato deve estar relacionado com a composição salivar combinada com a adição de sal. Sais, como sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos, presentes na saliva podem diminuir a solubilidade do analito na água e, conseqüentemente, aumentar a extração por causa do efeito *salting-out*. Quando foi adicionada maior quantidade de sal na fase doadora houve um grande aumento na resposta do TPM em matriz nos dois controles de qualidade estudados (CQB e CQA).

Além do efeito matriz, as amostras de saliva com adição de sal na fase doadora não estavam apresentando linearidade, desta forma, optou-se por dar continuidade ao estudo de CCD sem a adição do sal nas amostras de saliva e conseqüentemente o método foi validado com os parâmetros finais otimizados da HF-LPME. Os resultados finais do efeito matriz para as amostras de saliva estão dispostos na Tabela 18. Os resultados apresentados foram equivalentes quando avaliada a resposta obtida em solução e em matriz. Assim como nas amostras de plasma, o efeito matriz nas amostras de saliva apresentaram respostas para o TPM

com variação menor que 15,0 % entre as replicatas realizadas para cada controle, estando de acordo com o guia oficial (ANVISA, 2012).

**Tabela 18** - Resultado das análises de Efeito Matriz em em seis diferentes fontes de saliva sem adição de sal.

Controle	$a_{FMN}$	$b_{CV}$ (%)
CQB	97	5
CQA	116	10

a: Fator da matriz normalizado (Resposta do analito em matriz) / (Resposta do analito em solução padrão) \*100; b: Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100].

#### 4.7.2 Linearidade

As curvas analíticas foram desenvolvidas no método proposto de forma a detectar a menor concentração possível de analito na matriz, atendendo a faixa de concentração esperada para o TPM nas diferentes matrizes, com valores de precisão e exatidão aceitáveis. Para a definição das concentrações para a construção da curva analítica procurou-se na literatura (Tabela 1) referências da concentração esperada do TPM, a fim de traçar uma faixa de linearidade que atendesse a concentração a ser encontrada em cada paciente e pudesse detectar os fármacos nos tempos iniciais de administração.

A linearidade foi avaliada em quintuplicata fortificando-se alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma e 700  $\mu\text{L}$  de saliva, as quais foram submetidas ao procedimento de extração descritos no item 3.14. As concentrações plasmáticas e salivares empregadas foram de 1; 5; 10; 15; 20 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os dados das Tabelas 19 e 20 mostram que o modelo linear de regressão está bem ajustado para a HF-LPME em amostras de plasma e saliva, respectivamente.

**Tabela 19** - Linearidade do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma.

Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação linear	r	ANOVA Lack of fit	
			F	p
1,0 – 30,0	$y = 115173x - 3021,7$	0,9907	0,51	0,16

r = coeficiente de correlação, F<sub>tabelado</sub> = 2,81

**Tabela 20** - Linearidade do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva.

Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação linear	r	ANOVA <i>Lack of fit</i>	
			F	p
1,0 – 30,0	$y = 2257,7x - 513,26$	0,9922	0,67	0,61

r = coeficiente de correlação, FTabelado = 2,81

#### 4.7.3 LIQ, Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram realizadas em quintuplicata pela fortificação de 200  $\mu\text{L}$  de plasma e 700  $\mu\text{L}$  de saliva nas concentrações plasmáticas do LIQ, CQB, CQM e CQA e os resultados estão apresentados nas Tabelas 21 e 22 para amostras de plasma e saliva, respectivamente. Todos os valores estão abaixo dos preconizados pelos guias da ANVISA e EMA (abaixo de 20% para o LIQ e abaixo de 15% para o CQB, CQM e CQA).

**Tabela 21** - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas (n=5) do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma.

	Concentração nominal $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração obtida $\mu\text{g mL}^{-1}$	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
LIQ	1,0	1,0590	6,1	5,9
Intracorridas	5,0	5,0217	2,8	0,4
	15,0	15,5535	4,1	3,7
	20,0	20,3529	9,2	1,8
	30,0	29,7490	0,9	-0,8
Intercorridas <sup>a</sup>	1,0	1,0311	6,6	3,1
	5,0	5,0687	4,6	1,4
	15,0	15,6390	4,9	4,3
	20,0	20,6924	8,0	3,5
	30,0	29,6318	7,3	-1,2

a, três dias consecutivos

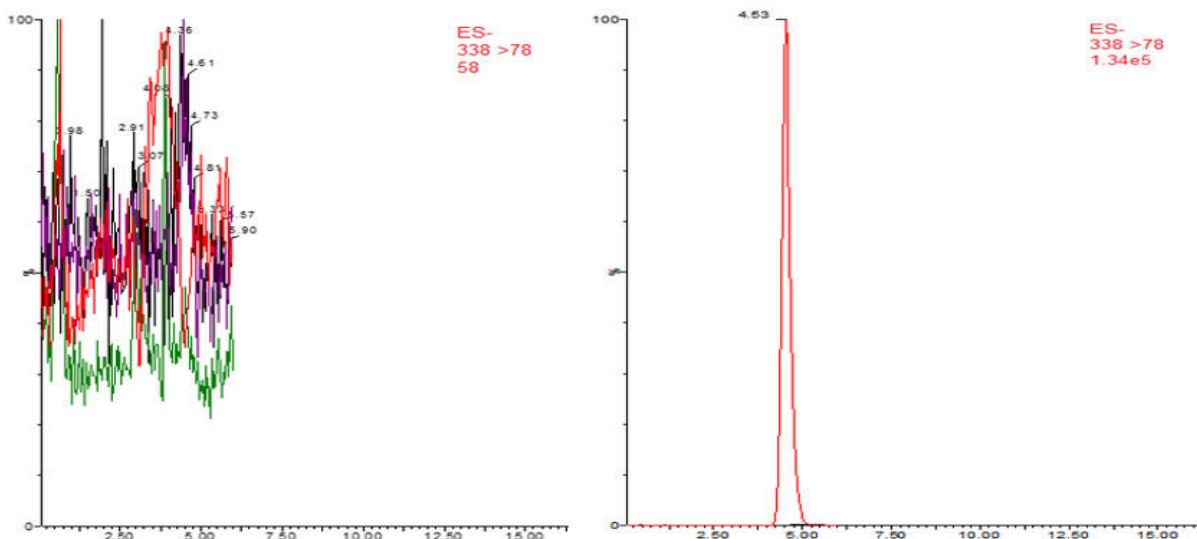
**Tabela 22** - LIQ, precisão e exatidão intracorridas e intercorridas (n=5) do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva.

	Concentração nominal $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração obtida $\mu\text{g mL}^{-1}$	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
LIQ	1,0	1,1078	4,0	10,8
Intracorridas	5,0	5,1826	2,0	3,6
	10,0	10,0438	2,1	0,4
	20,0	20,0239	7,4	0,1
	30,0	30,2286	5,4	0,8
	1,0	1,0085	7,9	0,8
Intercorridas <sup>a</sup>	5,0	5,2242	2,6	4,5
	10,0	10,1839	3,2	1,8
	20,0	20,8839	5,1	4,4
	30,0	31,1440	6,4	3,8

#### 4.7.4 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de 6 amostras de fontes diferentes de plasma branco, sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada. Também foi avaliada para 6 amostras de fontes diferentes de saliva branco. O método foi seletivo para ambas amostras quando comparados com os cromatogramas obtidos para o LIQ e não apresentou nenhum sinal analítico interferente no tempo de retenção do TPM, de modo que não há comprometimento da análise e corrobora com o fato da HF-LPME oferecer alta seletividade (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011) e ótima remoção dos interferentes presentes em matrizes complexas (BASHEER; LEE; OBBARD, 2004). Os resultados estão representados nas Figuras 22 e 23 para amostras de plasma e saliva, respectivamente.

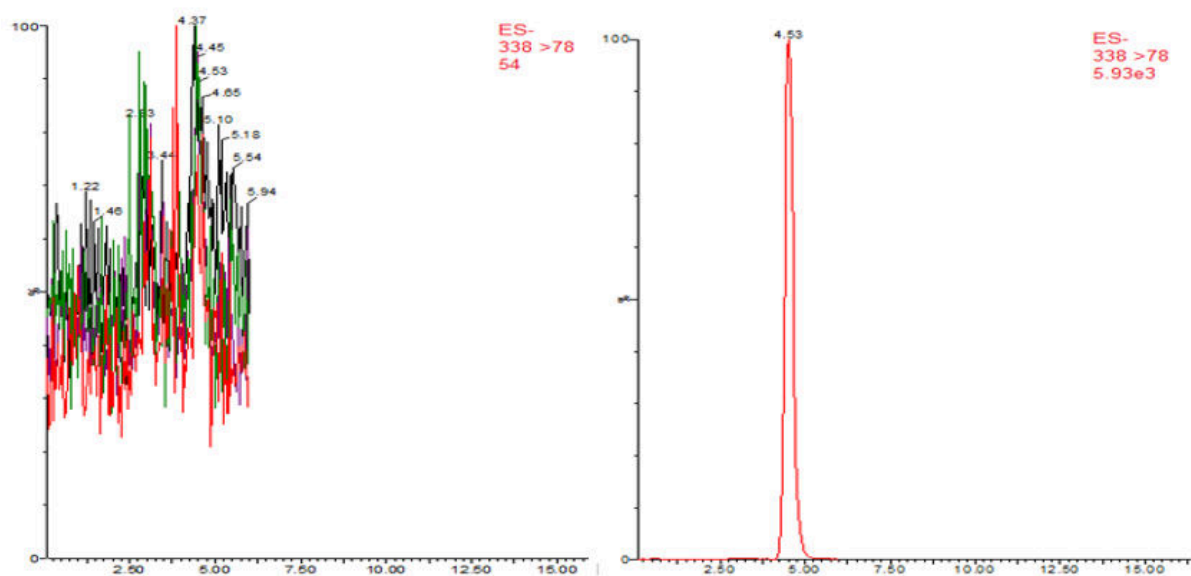
**Figura 22** - Cromatogramas referentes à análise de amostras de plasma branco (normal, hemolisado e lipêmico) e de uma amostra de plasma fortificada com TPM (LIQ).



Condições cromatográficas: coluna Ascentis Express C 18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 10 cm X 4,6 mm) e coluna de guarda Ascentis Express C 18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 3 mm X 4,6 mm). Fase móvel: acetonitrila:água (80:20, v/v), temperatura 40°C e vazão de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>.

Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

**Figura 23** - Cromatogramas referentes à análise de amostras de saliva branco e de uma amostra de saliva fortificada com TPM (LIQ).



Condições cromatográficas: coluna Ascentis Express C 18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 10 cm X 4,6 mm) e coluna de guarda Ascentis Express C 18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 3 mm X 4,6 mm). Fase móvel: acetonitrila:água (80:20, v/v), temperatura 40°C e vazão de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>.

Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.



#### 4.7.5 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado pela análise de uma amostra de plasma e saliva branco, seguida pela análise de uma amostra fortificada na concentração do LSQ seguida de duas amostras de plasma e saliva branco. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração por HF-LPME e não foi observado efeito residual em tempo próximo ao do TPM. Além disso, cada fibra foi utilizada uma única vez, o que contribuiu para o resultado (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011).

#### 4.7.6 Estabilidade

O teste de estabilidade foi realizado fortificando-se 200 µL de plasma e 700 µL de saliva com TPM nas concentrações plasmáticas e salivares referente ao CQB e CQA (n=3). Os testes mostraram que o TPM apresentou estabilidade nas condições de análise e armazenamento e apresentou valores adequados de precisão e exatidão, abaixo de 15% como preconizado pelos guias da Anvisa e EMA. Os resultados estão representados nas Tabelas 23 e 24 para amostras de plasma e saliva, respectivamente.

**Tabela 23** - Estabilidade (n=3) do método para análise do TPM por HF-LPME em plasma.

Estabilidade	Concentração nominal µg mL <sup>-1</sup>	Concentração obtida µg mL <sup>-1</sup>	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
Pós-processamento	5,0	4,9624	3,3	-0,7
	20,0	21,8845	6,6	9,4
Curta duração (4 horas)	5,0	4,9112	6,0	-1,8
	20,0	19,9385	7,5	-0,3
Congelamento e descongelamento (3 ciclos)	5,0	4,3320	2,5	-13,4
	20,0	17,2203	4,8	-13,9
Longa duração (28 dias)	5,0	5,1956	11,9	3,9
	20,0	21,9375	7,0	9,7

**Tabela 24** - Estabilidade (n=3) do método para análise do TPM por HF-LPME em saliva.

Estabilidade	Concentração nominal $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração obtida $\mu\text{g mL}^{-1}$	Precisão CV (%)	Exatidão EPR% (%)
Pós-processamento	5,0	4,5839	6,3	-8,3
	20,0	18,7888	3,9	-6,0
Curta duração (4 horas)	5,0	5,2409	3,3	4,8
	20,0	19,9584	7,4	-0,2
Congelamento e descongelamento (3 ciclos)	5,0	4,8003	2,0	-4,0
	20,0	21,3910	10,0	6,9
Longa duração (14 dias)	5,0	4,4436	2,1	-11,1
	20,0	21,8686	0,9	9,3

A estabilidade do TPM em solução metanólica foi avaliada nas concentrações do CQB e CQA (n=3) em soluções recém-preparadas e soluções preparadas e armazenadas durante quatro meses.

Para quantificação das amostras foi utilizada uma curva de calibração analítica. Como apresentado na Tabela 25, os testes mostraram que as soluções de TPM permaneceram estáveis, com valores de CV% e o EPR% abaixo de 10% como preconizado pelo guia da ANVISA.

**Tabela 25** - Estabilidade (n=3) da solução padrão de TPM.

Estabilidade	Concentração nominal ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
Amostras recém preparadas	5,0	5,0003	2,4	0,006
	20,0	20,1492	4,6	0,7
Amostras preparadas há 4 meses	5,0	5,0325	3,8	0,6
	20,0	19,5878	1,7	-2,1

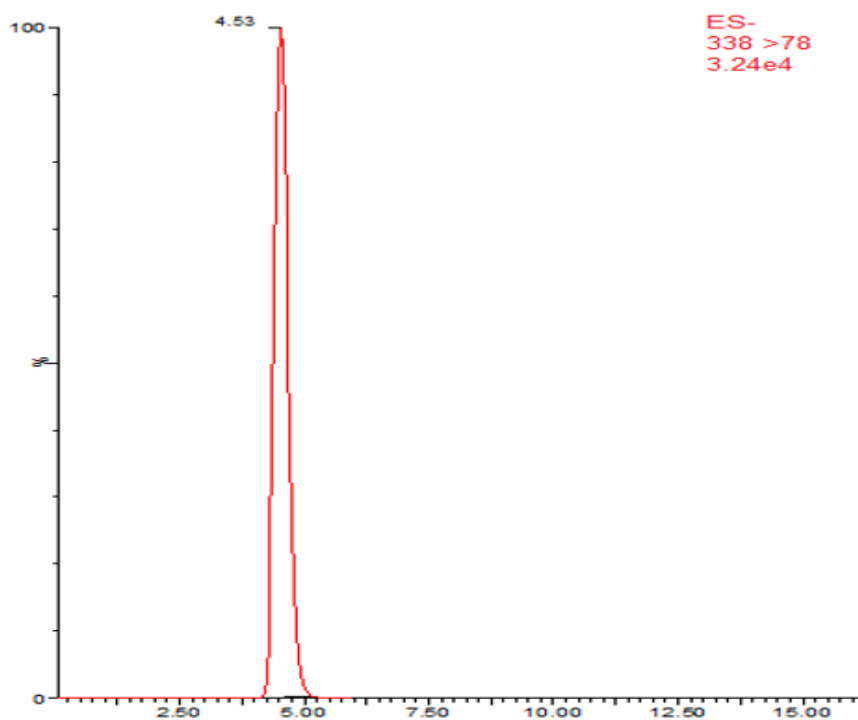
#### 4.8 Aplicação do método

Para demonstrar a aplicação do método, amostras de plasma e saliva de pacientes em tratamento com o TPM em diferentes doses foram analisadas. As Figuras a seguir apresentam os cromatogramas referentes a análise das amostras de um paciente em tratamento com o TPM em que a coleta foi realizada no vale. A

Figura 24 apresenta a amostra de plasma, onde a concentração plasmática encontrada foi de  $7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a Figura 25 demonstra a amostra de saliva, em que a concentração salivar encontrada foi de  $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As duas amostras mostraram quantificação para o TPM, apresentando valores de concentração dentro da faixa determinada ( $1$  a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Todas as amostras coletadas ( $n=3$ ) para as duas matrizes biológicas foram positivas para o TPM e puderam ser analisadas pelo método proposto.

Assim, a faixa alcançada para análise do TPM em amostras de plasma e saliva, utilizando uma tomada de amostra mínima, com precisão e exatidão comprovadas faz com que o método tenha uma aplicação bastante interessante na rotina analítica de monitoramento terapêutico, conseguindo quantificar o fármaco em concentrações bastante baixas típicas dos primeiros minutos após administração dos medicamentos.

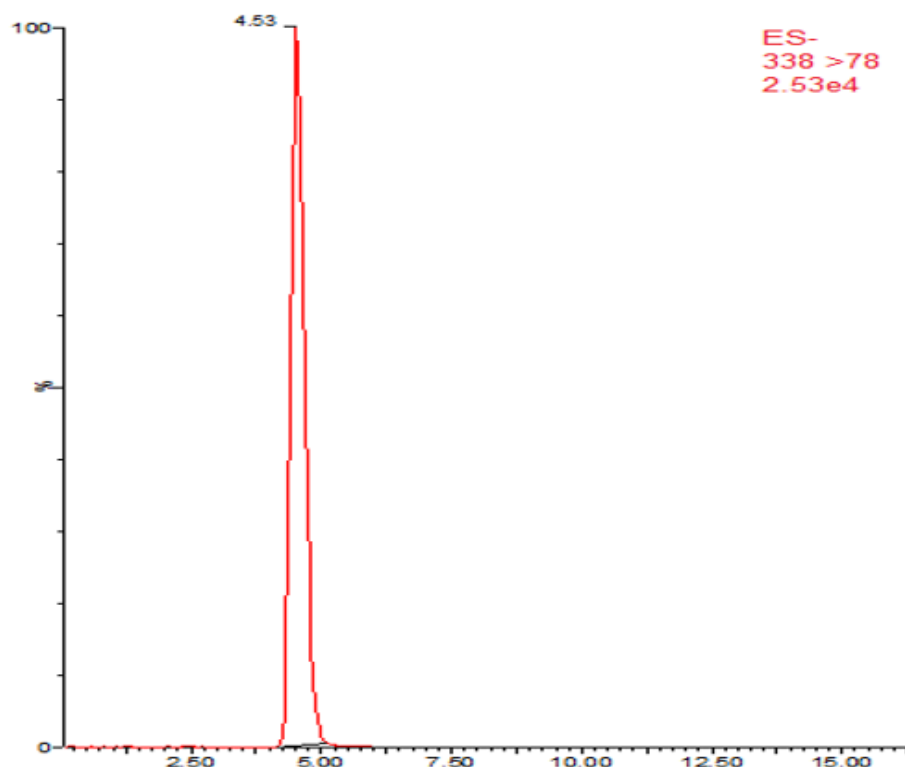
**Figura 24** - Cromatograma referente à análise da amostra de plasma coletada no vale de um paciente em tratamento com o TPM 100 mg (concentração plasmática de  $7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



Condições cromatográficas: coluna Ascentis Express C 18 ( $2,7 \mu\text{m}$ ,  $10 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ ) e coluna de guarda Ascentis Express C 18 ( $2,7 \mu\text{m}$ ,  $3 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ). Fase móvel: acetonitrila:água ( $80:20$ , v/v), temperatura  $40^\circ\text{C}$  e vazão de  $0,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

**Figura 25** - Cromatograma referente à análise da amostra de saliva coletada no vale de um paciente em tratamento com o TPM 100 mg (concentração salivar de  $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



Condições cromatográficas: coluna Ascentis Express C 18 ( $2,7 \mu\text{m}$ ,  $10 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ ) e coluna de guarda Ascentis Express C 18 ( $2,7 \mu\text{m}$ ,  $3 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ). Fase móvel: acetonitrila:água (80:20, v/v), temperatura  $40^\circ\text{C}$  e vazão de  $0,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.1.

Os resultados disponíveis na literatura para a matriz saliva correspondem a resultados obtidos por outras técnicas, como FPIA para análise de TPM (MILES et al., 2003), e embora seja um método prático por já haver kits comerciais prontos para a análise, é uma técnica cara e já foi apontada interferência de metabólitos no doseamento de TPM. Além disso, seu limite de quantificação é o maior entre todas as técnicas, em torno de  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (BAHRAMI et al., 2007; BERRY; PATSALOS, 2000; CHRISTENSEN et al., 2002), além de que o método apresenta uma seletividade bem abaixo da alcançada pela espectrometria de massas. Além disso, pode-se ressaltar que a composição do plasma é bastante distinta da saliva, principalmente quando se trata de ligação às proteínas plasmáticas, o que pode alterar a concentração a ser encontrada na saliva, uma vez que ela tende a refletir a concentração plasmática livre, e não a total (CHOO; HUESTIS, 2004). No caso do TPM, a ligação a proteínas plasmáticas é pequena, em torno de 15% (MILES et al., 2003).

Os dados apresentados demonstram que a quantificação de TPM em saliva é possível, assim como existe uma estreita relação entre a quantidade encontrada nessa matriz e a concentração plasmática do analito.

**Conclusão**

## 5 CONCLUSÃO

Esse trabalho descreve pela primeira vez a avaliação da técnica de HF-LPME para a determinação do TPM em amostras de plasma e saliva por LC-MS/MS. O desenvolvimento de um método utilizando esta técnica apresentou a vantagem de reduzido custo analítico e baixo consumo de solvente orgânico (50 µL de octanol), o que contribui não só para diminuir a contaminação do meio ambiente como para a melhor segurança do analista. Além disso, o uso de delineamento experimental para a otimização dos parâmetros que influenciam na microextração possibilitou a determinação das condições na qual a eficiência da extração é máxima. A validação do método mostrou que os parâmetros de desempenho analítico apresentaram resultados adequados de acordo com os guias oficiais, sendo portanto, considerados métodos precisos e exatos para ambas as matrizes biológicas. Assim, a HF-LPME mostrou ser vantajosa em virtude do baixo custo das fibras, não sendo necessária a sua reutilização o que evita problemas de efeito residual, moléculas grandes são impossibilitadas de atravessar para a fase aceptora devido ao diminuído tamanho dos poros da fibra e, além disso, em apenas um passo, essa técnica combina extração, concentração e limpeza da amostra, o que a torna uma técnica promissora para análise de fármacos em matrizes complexas. Ainda, a HF-LPME apresenta possibilidade de automação e é ambientalmente correta. Por fim, os métodos desenvolvidos por HF-LPME foram aplicados com sucesso em amostras de plasma e saliva de pacientes epilépticos em tratamento com TPM.

Em relação a aplicação do método, a monitorização terapêutica possibilita o delineamento de protocolos individualizados para o tratamento de epilepsia. Neste sentido, uma matriz biológica de coleta fácil e menos invasiva, como a saliva, é de grande interesse na prática clínica contribuindo para o bem estar do paciente.

Tem-se assim como perspectivas futuras disponibilizar um resultado seguro a respeito da concentração plasmática/salivar, sendo este o primeiro método descrito para quantificação de TPM em amostras de saliva utilizando espectrometria de massas. Ainda, esse é um trabalho que abre caminhos diferentes para realizar multianálises de fármacos anticonvulsivantes.

## Referências



REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**. Dispões sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos. 2012. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html). Acesso em: 16 fev. 2020.

AGUIRRE, M. A. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for metals enrichment: A useful strategy for improving sensitivity of laser-induced breakdown spectroscopy in liquid samples analysis. **Talanta**, v. 131, p. 348–353, 2015.

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Chromatography Methods in the Separation of Organic Compounds: **A Review**. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378-391, 2017.

ARCE, L. et al. Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 842–853, 2009.

BAHRAMI, A. et al. Hollow fiber supported liquid membrane extraction combined with HPLC- UV for simultaneous preconcentration and determination of urinary hippuric acid and mandelic acid. **Membranes**, v. 7, n. 1, 2017.

BAHRAMI, G. et al. High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1–2, p. 322–325, 2005.

BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 813, n. 1–2, p. 175–180, 2004.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B. A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1–2, p. 400–404, 2007.

BAUMANN, R. Salivary Monitoring of Antiepileptic Drugs. **Journal of Pharmacy Practice**, v.20, p.147-157, 2007.

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BEN-HANDER, G. M. et al. Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids. **Talanta**, v. 131, p. 590–596, 2015.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676–685, 2010.

BERRY, D.; PATSALOS, P. Comparison of topiramate concentrations in plasma and serum by fluorescence polarization immunoassay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.22, p. 460-464, 2000.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BORDIN, D. C. M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015.

BORGES, K. B.; DE FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos: orgânicos**. 1º Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Variables Quantitative. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

BRITZI, M. et al. Analysis of topiramate and its metabolites in plasma and urine of healthy subjects and patients with epilepsy by use of a novel liquid chromatography–mass spectrometry assay. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 25, n. 3, p. 314-322, 2003.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 11º Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 283-303.

BUENO, L. H. P. **Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

CAMPOS, L. F. A. et al. Planejamento experimental no estudo da maximização do teor de resíduos em blocos e revestimentos cerâmicos. **Cerâmica**, v. 53, p. 373–380, 2007.

CARNEIRO, R. L. et al. Métodos de gradiente para otimização simultânea: estudo de casos de sistemas alimentares. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 353–362, 2005.

CARRÃO, D. B. et al. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, v. 32, n. 19, p. 2746–2756, 2011.

CASS, Q. B; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. 1º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

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

CHA, Y. B.; MYUNG, S. W. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine sample using HPLC/UV and three phase hollow fiber-liquid phase microextraction (HF- LPME). **Bull Korean Chem Soc**, v. 34, n. 11, p. 3444-3450, 2013.

CHEN, S.; CARVEY, P. M. Validation of liquid-liquid extraction followed by flow-injection negative ion electrospray mass spectrometry assay to Topiramate in human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 2, p. 159–163, 2001.

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v.383, n. 1-2, p. 30-40, 2007.

CHOO, R. E.; HUESTIS, M. A.; Oral fluid as a diagnostic tool. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, p.1273–1287, 2004.

CHRISTENSEN, J.; HOJSKOV, C.; POULSEN, J. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for topiramate analysis in plasma and cerebrospinal fluid: validation and comparison with fluorescence polarization immunoassay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.24, p. 658–664, 2002.

CIFUENTES, C.; MENNICKENT, S.; DE DIEGO, M. Quantitative Determination of Topiramate in Human Breast Milk. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 7, n. 5, p. 334-338, 2016.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L; BONATO, P. B. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CONTIN, M. et al. Simple and rapid liquid chromatographic – turbo ion spray mass spectrometric determination of topiramate in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 761, n. 1, p. 133–137, 2001.

CONTIN, M. et al. Topiramate Therapeutic Monitoring in Patients With Epilepsy: Effect of Concomitant Antiepileptic Drugs. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 24, n. 3, p. 332-337, 2002.

CONWAY, J. M. et al. A sensitive capillary GC-MS method for analysis of topiramate from plasma obtained from single-dose studies. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 9, p. 1071– 1076, 2012.

CROSS, J. H.; RINEY, C. J. Topiramate. In: SHORVON, S.; PERUCCA, E.; ENGEL JR, J. (Orgs). **The treatment of epilepsy**. 3 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. p. 673-683.

DA LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Challenges in Green Analytical Chemistry**. **RSC greenchemistry series**. 13<sup>o</sup> Ed. Cambridge: RSC pub, 2011. p. 90-94.

DE ALMEIDA, F. A. et al. A weighted mean square error approach to the robust optimization of the surface roughness in an AISI 12L14 free-machining steel-Turning process. **Strojnicki Vestnik/Journal of Mechanical Engineering**, v. 64, n. 3, p. 147–156, 2018.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

DEJAEGHER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 141–158, 2011.

DERRINGER, G. e SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DESOUBRIES, C.; CHAPUIS-HUGON, F.; BOSSÉE, A.; PICHON, V. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction of organophosphorous nerve agent degradation products from complex samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 900, p. 48-58, 2012.

DOOSE, D. R. et al. Single-dose pharmacokinetics and effect of food on the bioavailability of topiramate, a novel antiepileptic drug. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 36, n. 10, p. 884–891, 1996.

DOS SANTOS MAGALHÃES, I. R.; BONATO, P. S. Enantioselective determination of chloroquine and its n-dealkylated metabolites in plasma using liquid-phase microextraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 16–17, p. 3106–3116, 2008.

DROBITCH, R.; SVENSSON, C. Therapeutic drug monitoring insaliva. **An update. Clinical Pharmacokinetics**, v.23, p. 365-379, 1992.

DUPOUEY, J. et al. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in human plasma samples using an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 12, p. 2053–2060, 2016.

EBRAHIMZADEH, H. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of gabapentin in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, n. 2, p. 221–226, 2010.

EBRAHIMZADEH, H. et al. Optimization of carrier-mediated three-phase hollow fiber microextraction combined with HPLC-UV for determination of propylthiouracil in biological samples. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 1043-1049, 2011.

EBRAHIMZADEH, H. et al. Simultaneous determination of chlorpheniramine maleate and dextromethorphan hydrobromide in plasma sample by hollow fiber liquid phase microextraction and high performance liquid chromatography with the aid of chemometrics. **Talanta**, v. 94, p. 77-83, 2012.

EL-YAZBI, A. F. et al. Spectrofluorimetric Determination of Topiramate and Levetiracetam as Single Components in Tablet Formulations and in Human Plasma and Simultaneous Fourth Derivative Synchronous Fluorescence Determination of their Co-Administered Mixture in Human Plasma. **Journal of Fluorescence**, v. 26, p. 1225-1238, 2016.

EMIDIO, E. S. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 24, p. 2175-2183, 2010.

ESRAFILI, A. et al. Measurement of fluoroquinolone antibiotics from human plasma using hollow fiber liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 3, p. 343-354, 2012.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127–133, 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)>. Acesso em: 01 fev de 2017.

FERRARI, A. R. et al. Influence of Dosage, Age, and Co-medication on Plasma Topiramate Concentrations in Children and Adults with Severe Epilepsy and Preliminary Observations on Correlations with Clinical Response. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 25, n.3, p. 700-708, 2003.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007b.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 2–14, 2007a.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 44-62, 2017.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Topamax**: topiramate, prescribing information. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/020844s041lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020844s041lbl.pdf)>. Acesso em: 16 Fev. 2020.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquidphase microextraction: principles and applications. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3, p. 271–294, 2012.

GIACOMINO, A. et al. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A Review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, n. 2, p. 122–139, 2011.

GORODISCHER, R. et al. Saliva versus blood sampling for therapeutic drug monitoring in children: patient and parental preferences and an economic analysis. **Therapy Drug Monitoring**, v.16, p. 437-443, 1994.

GOSWAMI, D. et al. Bioanalytical LC-MS/MS method validation for plasma determination of topiramate in healthy Indian volunteers. **Biomedical Chromatography**, v.23, p. 1227-1241, 2009.

GRITTI, C. C. et al. Desempenho ocupacional, qualidade de vida e adesão ao tratamento de pacientes com epilepsia. **Rev Ter Ocup Univ São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 93-101, 2015.

HADI, H.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of trace mitiglinide in biological fluids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 895-896, p. 131-136, 2012.

HADJMOHAMMADI, M.; GHAMBARI, H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 44-49, 2012.

HAHN, R. Z. et al. Determinação simultânea de topiramato, carbamazepina, fenitoína e fenobarbital em plasma empregando cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 720-724, 2013.

HANRAHAN, G.; MONTES, R.; GOMEZ, F. A. Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: A critical review of modern applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 169-179, 2008.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, p. 2-13, 2012.

HIDAL, N.; ISMAIL, A.F.; WRIGHT, C. **Membrane Fabrication**. 1º Ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2015, p. 758.

HUH, H. J. et al. Factors Influencing Serum Topiramate Concentrations in Routine Therapeutic Drug Monitoring in Korean Adult Patients With Epilepsy. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 35, n. 2, p. 177-182, 2013.

HUMPHREY, S.; WILLIAMSON, R. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, p.162-169, 2001.

IBRAHIM, F. A. et al. Chromatographic determination of zonisamide, topiramate and sulpiride in plasma by a fluorescent 'turn-on' chemosensor. **Bioanalysis**, v. 9, n. 14, p. 1049-1064, 2017.

ISHIKAWA, A. A. et al. Determination of topiramate by capillary electrophoresis with capacitively-coupled contactless conductivity detection: A powerful tool for therapeutic monitoring in epileptic patients. **Electrophoresis**, v. 39, n. 20, p. 2485-2626, 2018.

JACOB III, P. et al. Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3' hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 3-4, p. 267-276, 2011.

JONSSON, J. A; MATHIASSEN, L. Membrane extraction techniques in bioanalysis. *Chromatographia*, v. 52, n. 1, p. s8-s11, 2000.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 113–119, 2011.

KIM, K. B. et al. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 4, p. 771–777, 2011.

KINTZ, P.; SPIEHLER, V.; NEGRUSZ, A. Alternative Specimens. In: JICKELLS, S; NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. Pharmaceutical Press. Cap. 6, p. 165 – 181, 2008.

KUHN, J.; KNABBE, C. Fully validated method for rapid and simultaneous measurement of six antiepileptic drugs in serum and plasma using ultra-performance liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 110, p. 71–80, 2013.

LEE, J. et al. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid- phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 2, p. 253–268, 2008.



LI, J. Factorial Designs. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v.1, p. 364-378, 2003.

LIN, K. Topiramato: Uma Molécula Multifacetada. **Revista Neurociência**, v. 19, n. 1, p. 8–9, 2011.

LIU, R. S.; TANG, Y. J. Tuber melanosporum fermentation medium optimization by Plackett- Burman design coupled with Draper-Lin small composite design and desirability function. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3139–3146, 2010.

LIU, T. et al. Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight antiepileptic drugs and an active metabolite in human plasma using polarity switching and timed selected reaction monitoring. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 176, 2019.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1988.

MALAKOVA, J. et al. A capillary GC method using nitrogen phosphorus detection for determination of topiramate in patients with epilepsy. **Chromatographia**, New York, v. 66, n. 5, p. 363-367, 2007.

MANDRIOLI, R. et al. Determination of topiramate in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1319–1323, 2010.

MARTINC, B. et al. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 962, p. 82–88, 2014.

MATAR, K. M. Therapeutic drug monitoring of topiramate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 411, n. 9–10, p. 729–34, 2010.

MILES, M.V.; TANG, P.H.; GLAUSER, T.A.; RYAN, M.A.; GRIM, S.A. Alternative to Serum Monitoring. **Pediatric Neurology**, v.29, p.143, 2003.

MILOSHESKA, D. et al. Simple and sensitive high performance liquid chromatography method with fluorescence detection for therapeutic drug monitoring of topiramate. **Acta chimica Slovenica**, v. 62, n. 2, p. 411–419, 2015.

MILOSHESKA, D.; ROŠKAR, R. A novel LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of topiramate and its main metabolites in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 180–188, 2017.

MIOR, R. et al. Desenvolvimento de um método analítico baseado em microextração líquido-líquido para a determinação de cromo (VI) em amostras aquosas com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 942–946, 2013.

MONTGOMERY D. C. **Design and analysis of experiments**. 8ª Ed. New York: John Wiley & Sons, 2013.

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

MOREIRA, B. J.; MICHIKO, J.; YOKOYA, C. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos , inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2015.

MOSHÉ, S. L. et al. Epilepsy: New advances. **The Lancet**, v. 385, n. 9971, p. 884–898, 2015.

MUTHUKUMAR, M.; MOHAN, D.; RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box Behnken design of experiments. **Cement and Concrete Composites**, v. 25, n. 7, p. 751–758, 2003.

MYERS, W. R. Response surface methodology. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v. 1, p. 858-869, 2003.

MYLONAS, P. G. et al. Adequacy of salivary 17-hydroxyprogesterone determination using various collection methods. **Steroids**, v.71, n. 3, p.273-276, 2006.

NCUBE, S. et al. Multivariate optimization of the hollow fibre liquid phase microextraction of muscimol in human urine samples. **Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1033, p. 372-381, 2016.

NI, Y. et al. Simultaneous determination of phentermine and topiramate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its application in pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 444–449, 2015.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Disponível em <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta-Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p. 8-35, 2009.

OGUNI, H. Diagnosis and treatment of epilepsy. **Epilepsia**, v. 45, n. 8, p. 13–6, 2004.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 290–307, 2014.

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

PARK, D. et al. Simultaneous determination of 18 psychoactive agents and 6 metabolites in plasma using LC–MS/MS and application to actual plasma samples from conscription candidates. **Forensic Science International**, v. 288, p. 283-290, 2018.

PARK, J. Determination of plasma topiramate concentration using LC-MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers. **Biomed. Chromatogr**, v. 22, p. 822–829, 2008.

PATSALOS, P. N. et al. Antiepileptic drugs - Best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1239–1276, 2008.

PATSALOS, P. N. et al. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. **Epilepsia**, v. 43, n. 4, p. 365–385, 2002.

PAWLISZYN, J.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, n. 6, p. 291–307, 2006.

PAYÁN, M. R. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n.2, p. 332-341, 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 817, n. 1, p. 3–12, 2005.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 132–142, 2008.

PEDRAZZOLI, J. et al. Estudo de bioequivalência entre duas formulações de topiramato comprimidos revestidos de 100 mg, em voluntários sadios após administração de dose única. **Grupo editorial Moreira Jr**, v. 71, n. 8, p. 251-256, 2014.

PERSENIUS, M. et al. Quality of life and sense of coherence in young people and adults with uncomplicated epilepsy: A longitudinal study. **Epilepsy and Behavior**, v. 47, p. 127–131, 2015.

PERUCCA, E. Clinical pharmacokinetics of new generation antiepileptic drugs at the extremes of age: An update. **Clinical Pharmacokinet**, v. 52, n. 8, p. 627-645, 2013.

PERUCCA, E. Clinical pharmacology and therapeutic use of the new antiepileptic drugs. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 15, p. 405–417, 2001.

PERUCCA, E.; TOMSON, T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 5, p. 446–456, 2011.

PIROOZI, F. et al. Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction Combined With High Performance Liquid Chromatography for Preconcentration and Determination of Cabergoline in Biological Samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 5, p. 760–771, 2014.

POPOV, T. V. et al. Determination of topiramate in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Acta Chimica Slovenica**, v. 60, n. 1, p. 144–50, 2013.

PROSEN, H. Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6776–6808, 2014.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565–574, 2003.

PUCCI, V.; RAGGI, M. A. Analysis of antiepileptic drugs in biological fluids by means of electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, n. 4-5, p. 767-782, 2005.

REZAEI, M. et al. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 161–168, 2010.

ROSENTHAL, E.; HOFFER, E.; BEN, H.; BADARNI, S.; BENDERLY, A.; HEMLI, Y. Use of saliva in home monitoring of carbamazepine levels. **Epilepsia**, v.36, p.72-74, 1995.

ROZET, E. et al. Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 160-171, 2011.

RYAN, M. et al. Correlation of lamotrigine concentrations between serum and saliva. **Pharmacotherapy**, v.23, p.1550-1557, 2003.

SANTOS, G. S. C. **Saliva: Identificação de variáveis fundamentais para a recolha de amostras de um biobanco**. 2014. 158 f. Dissertação (Mestrado em Medicina dentária). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Católica Portuguesa. Viseu, 2014.

SANTOS, P. P. A. Et al. Saliva: Métodos atuais para coleta e obtenção da amostra. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 48, n. 1 -3, p. 95-98, 2007.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1–14, 2010.

SERESHTI, H.; KARIMI, M.; SAMADI, S. Application of response surface method for optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of water-soluble components of Rosa damascena Mill. essential oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 198–204, 2009.

SHANK, R. P. et al. An Overview of the Preclinical Aspects of Topiramate: Pharmacology, Pharmacokinetics, and Mechanism of Action. **Epilepsia**, v. 41, n. s1, p. 3–9, 2000.

SHIBATA, M. et al. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 12, p. 1519–1528, 2012.

SILVIA, C.; GALEGO, M.; MIZIARA, I. D. Epilepsia e trabalho: quando a epilepsia deve ser considerada incapacitante? Epilepsy and work: when the epilepsy should be considered incapacitating? **Saúde, Ética & Justiça**, v. 16, n. 2, p. 103–110, 2011.

SIMÕES, A. R.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of isradipine and its main metabolite followed by chiral HPLC analysis: application to an in vitro biotransformation study. **Anal Bioanal Chem.** v. 399, n.7, p. 2435-2443, 2011.

ST. LOUIS, E.; ROSENFELD, W.; BRAMLEY, T. Antiepileptic Drug Monotherapy: The Initial Approach in Epilepsy Management. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 2, p. 77–82, 2009.

STALIKAS, C. et al. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 175–189, 2009.

SUBRAMANIAN, M.; BIRNBAUM, A. K.; REMMEL, R. P. High-Speed Simultaneous Determination of Nine Antiepileptic Drugs Using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 3, p. 347–356, 2008.

TAHMASEBI, E.; YAMINI, Y.; SALEH, A. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 20–21, p. 1923–1929, 2009.

TARLEY, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58–67, 2009.

TOKI, T.; IWASAKI, T.; ISHII, M. Topiramate Blood Levels During Polytherapy for Epilepsy in Children. **American Journal of Therapeutics**, v. 0, n. 1-7, p. 1075-2765, 2016.

TOMSON, T.; JOHANNESSEN, S. I. Therapeutic monitoring of the new antiepileptic drugs. **European Journal of Clinical Pharmacology**, V. 55, N. 10, p. 697–705, 2000.

VIDAL, S. et al. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 3, p. 209–217, 2004.

VINDENES, V. et al. Oral Fluid is a Viable Alternative for Monitoring Drug Abuse: Detection of Drugs in Oral Fluid by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Comparison to the Results from Urine Samples from Patients Treated with Methadone or Buprenorphine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 32-39, 2011.

WANG, L. et al. Simultaneous determination of topiramate, carbamazepine, oxcarbazepine and its major metabolite in human plasma by SFC-ESI-MS/MS with polarity switching: Application to therapeutic drug monitoring. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4775-4783, 2016.

WILLE, S. M; LAMBERT, W. E. Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n.7, p. 1381-1391, 2007.

WOLF, C. E.; CROOKS, C. R.; POKLIS, A. Rapid gas chromatographic procedure for the determination of topiramate in serum. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 661– 663, 2000.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 127–133, 2012.

YIN, L. et al. A Parallel-Column LC–MS/MS Method for High-Throughput Analysis of Eight Antiepileptic Drugs in Clinical Therapeutic Drug Monitoring. **Chromatographia**, v. 80, n. 1, p. 137–143, 2017.

YIN, L. et al. Simultaneous determination of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its application in therapeutic drug monitoring. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 5, p. 964–972, 2016.

YUDTHAVORASIT, S.; CHIAOCHAN, C.; LEEPIPATPIBOON, N. Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 172, n. 1, p. 39-49, 2011.

ZARGAR, B., PARHAM, H., HATAMIE, A. Hollow Fiber Liquid Based Microextraction of Nalidixic Acid in Urine Samples Using Aliquat 336 as a Carrier Combined with High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 2, p. 257-263, 2016.

ZANETTE, J. C. *Adsorção de prednisona em carvões ativados – modelagem matemática*. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de engenharias e ciências exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.

ZHOU, J. et al. Orthogonal array design for optimization of hollow-fiber-based liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for study of the pharmacokinetics of magnoflorine in rat plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 7, p. 1951-1960, 2012.



Anexos

## ANEXOS

## ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 008/2018  
kms

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2018.

Às pesquisadoras  
Cristina Martiniano Montanari  
Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani  
FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP analisou e aprovou em sua 176ª reunião extraordinária, realizada em 26/03/2018, a emenda (E1) ao projeto de pesquisa de registro CAAE nº 54702916.8.0000.5403, cujo novo título é: "Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (hf-lpme) para análise do topiramato em plasma e saliva por LC-MS/MS", conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.625.464.

Lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
Coordenadora do CEP/FCFRP

**ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

1

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA PARA ANÁLISE DO TOPIRAMATO EM PLASMA E SALIVA POR LC-MS/MS****LEIA COM ATENÇÃO**

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar caso mude de ideia sem ser prejudicado e o seu atendimento será o mesmo se participar ou não. Em caso de desistência você deverá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

**MOTIVO DA PESQUISA**

No tratamento da epilepsia, alguns pacientes necessitam usar dois ou mais remédios ao mesmo tempo e, alguns estudos mostraram que a maioria desses remédios pode causar efeitos indesejáveis no paciente como tontura, cansaço e sono. Para diminuir esses efeitos indesejáveis e ao mesmo tempo dar continuidade ao tratamento, o médico precisa determinar a quantidade certa do remédio. Então, os pesquisadores Cristina Martiniano Montanari, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila de Freitas Lima e a Prof<sup>a</sup> Dra. Cristiane Masetto de Gaitani estão fazendo esta pesquisa para desenvolver um meio mais rápido e seguro de medir a presença do topiramato, um medicamento usado contra epilepsia, no sangue e na saliva de pacientes epiléticos em tratamento.

**PROCEDIMENTOS DA PESQUISA**

Para o sangue a coleta será feita em um volume de 10 mL (aproximadamente 1 colher de sopa) por paciente, no ambulatório do HCFMRP-USP pela pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Priscila de Freitas Lima, sendo aproveitado o dia do seu exame de rotina. Será realizada uma única coleta de sangue. Se houver sobra de sangue nas pesquisas realizadas, este será jogado fora ao final da pesquisa. E para a saliva utilizado um dispositivo próprio (Salivette®), que é composto por um rolo de algodão estéril que é colocado na boca do paciente por um ou dois minutos e então colocado dentro de um pequeno frasco plástico.

Podem participar do estudo pacientes em tratamento regular para epilepsia em uso de topiramato juntamente a qualquer outro antiepilético. Se você participar do estudo, deverá continuar tomando seus remédios como de costume, sem nenhuma alteração de dose ou horário.

**RISCOS E/OU DESCONFORTOS**

O desconforto que pode ocorrer é a picada da agulha para coleta do seu sangue. Esta pesquisa não oferece riscos e desconfortos adicionais, pois ela não irá alterar o tratamento do paciente.

**BENEFÍCIOS**

A sua participação no estudo fornecerá informações que poderão ser úteis no tratamento da epilepsia em geral e para os pacientes que utilizam ou utilizarão esse remédio.

Versão emenda – 07/12/2017