

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

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 μm , 10 cm X 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Ascentis Express C 18 (2,7 μm , 3 mm X 4,6 mm), temperatura de 40°C, vazão de 0,25 mL.min⁻¹ 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 μL de plasma ou 700 μL de saliva, 3,5 mL de solução fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹ pH 6,0 como fase doadora. O solvente utilizado para impregnar a fibra foi o 1-octanol. Como fase aceptora foram utilizados 80 μL 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.

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

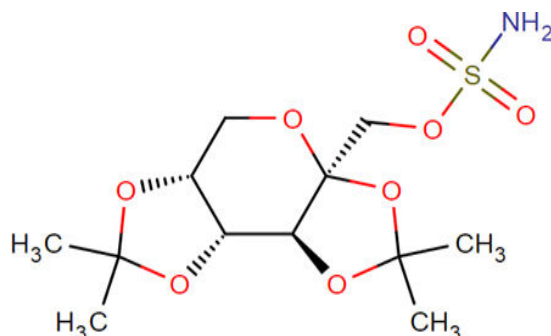
opções farmacológicas, além de trazer novas perspectivas para os pacientes com epilepsia. Mais recentemente ainda surgiram os m de terceira geração, como a lacosamida e a rufinamida (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). A procura por novos FAEs tem por objetivo promover a segurança do seu uso, com menos 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)- β -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⁻¹, 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 ($C_{m\acute{a}x}$) do TPM, em dose única, varia entre 1,4-4,3 horas ($T_{m\acute{a}x}$) (DOOSE et al., 1996). Seu volume de distribuição (V_d) 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 ($T_{1/2}$) 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 γ -aminobutírico (GABA) no receptor GABA_A 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).

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

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

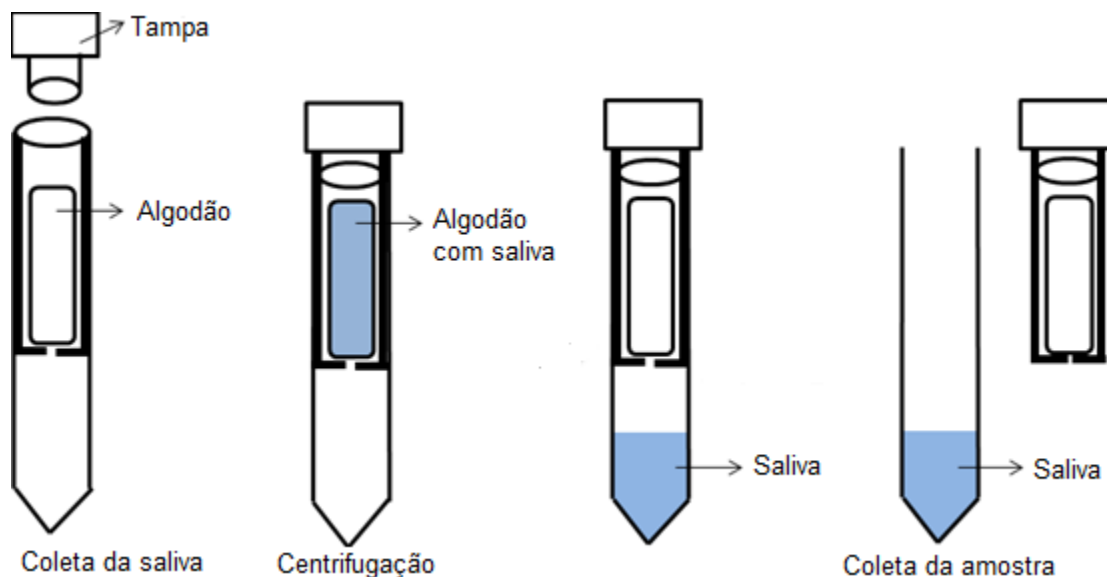
O monitoramento terapêutico de diversos fármacos em saliva geralmente tem se apresentado menos invasivo ao paciente e barato em relação ao uso de outros

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; REZAEI 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 μ 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).

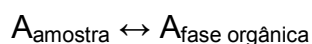
Entre as vantagens desta técnica estão: baixo custo da fibra, o que permite que cada unidade de extração seja utilizada uma única vez, evitando problemas de carregamento de amostra (“*carry over*”) ou de contaminação cruzada (BEN-HANDER et al., 2015; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007), baixo consumo de 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_d é o volume da fase doadora, R é a recuperação e V_a 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).

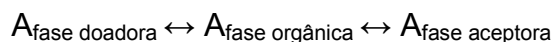
Esta técnica pode ser utilizada de dois modos: com duas ou três fases de acordo com as características do analito em questão. No sistema de duas fases os analitos são extraídos a partir de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico (fase aceptora), o qual se encontra imobilizado 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:



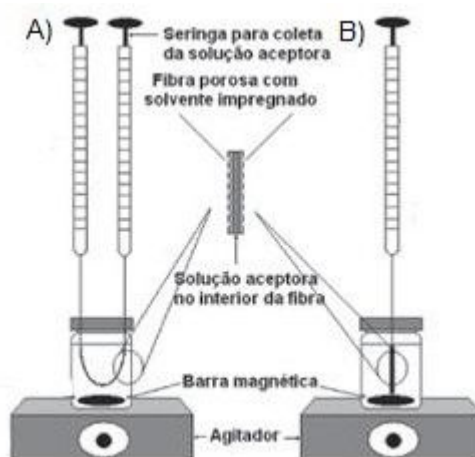
Independentemente do modo como esta técnica é realizada, o pH da fase doadora deve ser ajustado para que o composto permaneça em sua forma não ionizada, para diminuir a solubilidade do analito no meio aquoso e favorecer sua passagem para o solvente orgânico. O pH da fase aceptora, no caso de 3 fases, 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).

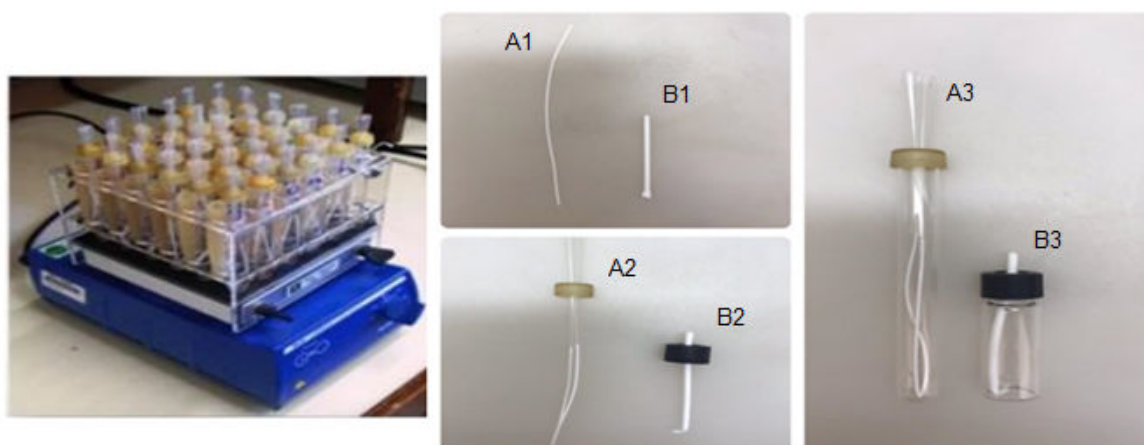
Figura 3 - HF-LPME empregando configuração em "U" (A) e "haste" (rod-like) (B).



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 aceptora 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 α 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 α 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).

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

REFERÊNCIAS¹

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. 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.

¹ 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° 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>. 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>. 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.