UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Luiza Saldanha Ribeiro Barros
Orientadora: Prof[a]. D[ra]. Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 23/03/16. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Barros, Luiza Saldanha Ribeiro
Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2016.
100 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto

1. Eletroforece capilar. 2. Lamotrigina. 3. HF-LPME. 4. DLLME

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Saldanha Ribeiro Barros

Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^{a}. D^{ra}. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Liége e Hiram, por toda dedicação, amor, confiança e por sempre acreditarem em mim.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por essa oportunidade de crescimento e pela força necessária para superar as dificuldades.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, por sempre me entenderem e sempre acreditarem em mim.

À Profa. Dra. Cristiane Maseto de Gaitani por todas as discussões científicas, tempo, dedicação, carinho e por tornar possível esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por todos os ensinamentos, apoio e por sempre me receber em seu laboratório.

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos: Fernando, Jennifer, Larissa, Letícia, Luciana e Maíra pelas discussões científicas, e por tornar o dia a dia mais alegre. À Mariana pelo carinho e pela infinita disposição em ajudar. Aos amigos Aline e Rodrigo pela amizade, calma, apoio e infindáveis ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de metabolismo in vitro e técnicas de separação, principalmente a Nayara e Simone pelo carinho no nosso convívio. Um agradecimento especial ao Daniel pela ajuda na realização de parte deste trabalho.

À minha amiga Flávia pela amizade, ajuda e disposição.

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BARROS, L. S. R. **Avaliação de microtécnicas de extração para análise de lamotrigina em plasma de pacientes epilépticos por eletroforese capilar.** 2016. 98f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A lamotrigina (LTG) é um fármaco pertencente à classe das feniltriazinas utilizado no tratamento de crises epilépticas 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 da LTG, a monitorização terapêutica nos pacientes que fazem uso deste fármaco é necessária para ajuste de dose individual e evitar os efeitos adversos. Assim, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de duas técnicas de microextração: a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para análise da lamotrigina em amostras de plasma de pacientes epilépticos. Primeiramente foram definidas as condições eletroforéticas: foi utilizado um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo. O eletrólito de corrida (BGE) foi composto por ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES), na concentração de 130 mmol L^{-1} e pH 5,0. As análises foram realizadas à temperatura de 20°C e tensão de 15 kV. A amostra foi injetada hidrodinamicamente (0,5 psi por 10 s) e a detecção foi feita em 214 nm. Nestas condições a LTG e o padrão interno (PI), lidocaína, puderam ser analisados em menos de 7 minutos. A HF-LPME foi avaliada no modo de 3 fases, usando 500 µL de plasma e 3,5 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 como fase doadora. O solvente utilizado para impregnar a fibra foi o 1-octanol. Como fase aceptora foram utilizados 60 µL de solução de ácido clorídrico pH 4,0. Para avaliação da DLLME, foi necessária uma etapa de pré-tratamento da amostra (500 µL de plasma) com 1 mL de acetonitrila. Após isto, 1,3 mL do sobrenadante foram adicionados a 4 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,0 e 120 µL de clorofórmio (solvente extrator) foram injetados nesta amostra aquosa e 165 µL de fase sedimentada foram recuperados. As características de desempenho analítico para ambos os métodos foram avaliadas, sendo obtida linearidade na faixa de concentração plasmática de 1-20 µg/mL e limite inferior de quantificação (LIQ) de 1 µg mL^{-1}. Os ensaios de precisão e exatidão apresentaram valores de acordo com os guias oficiais. Além disso, os métodos foram seletivos, não apresentaram efeito residual e as amostras foram estáveis. Os valores de recuperação foram de 54,3 e 23% para HF-LPME e DLLME, respectivamente. Os métodos validados foram aplicados com sucesso em amostras de plasma de pacientes epilépticos em tratamento com a LTG. Além disso, as duas técnicas foram comparadas e a HF-LPME apresentou vantagens em relação à DLLME, mostrando ser uma técnica promissora para análise de matrizes complexas, com reduzido consumo de solvente orgânico e possibilidade de automação.

Palavras-chave: lamotrigina, eletroforese capilar, plasma, microextração em fase líquida com fibras ocas, microextração líquido líquido dispersiva.

ABSTRACT

BARROS, L. S. R. **Evaluation of microextraction techniques to analysis of lamotrigine in plasma samples of epileptic patients by capillary electrophoresis.** 2016. 98f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Lamotrigine (LTG) is an antiepileptic drug, which belongs to the class of phenyltriazine 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 LTG 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 two microextraction techniques: the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) to analyze LTG in plasma samples of epileptic patients. First of all, the eletroforetic conditions were optimized. A fused-silica uncoated capillary with 75 µm internal diameter, and 50 cm effective length was used. The 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 130 mmol L^{-1} pH 5.0 was chosen as background electrolyte (BGE). The temperature and the voltage were kept constant at 20°C and 15 kV respectively. For sample injection, hydrodynamic injection mode was used, with a pressure of 0.5 psi applied for 10 s. The wavelength was set at 214 nm. Under final conditions, LTG and the internal standard (IS) lidocaine were analyzed in less than 7 minutes. HF-LPME was evaluated in the three phase mode. The analyte was extracted from 4.0 mL of a basic donor phase (composed of 500 µL of plasma and 3.5 mL of sodium phosphate solution 50 mmol L^{-1} pH 9.0) into an organic phase composed of 1-octanol immobilized in the pores of the hollow fiber, and further into an acidic acceptor phase (hydrochloric acid solution pH 4.0) placed in the lumen of the fiber. To evaluate DLLME, the plasma samples were pretreated to remove the proteins, and 500 µL of plasma sample was mixed with 1 mL of acetonitrile. After that, 1,3 mL of the upper layer was added to 4 mL of sodium phosphate solution 50 mmol L^{-1} pH 9.0, and 120 µL of chloroform (extracting solvent) was rapidly injected in the aqueous sample and 165 µL of the sedimented phase was collected. Under the optimized conditions, both methods were linear over the plasmatic concentration range of 1.0–20.0 µg mL^{-1} and the lower limit of quantification (LLOQ) was 1.0 µg mL^{-1}. Both methods showed good precision, accuracy, selectivity to LTG, with no carryover and the samples were stable under the studied conditions. The recovery were 54,3 and 23% to HF-LPME and DLLME respectively. The validated methods were successfully applied for the quantification of LTG in plasma samples of epileptic patients. The techniques were compared and HF-LPME was more advantageous for being more suitable to analysis of complex matrices using small amount of organic solvent, and also can be automated.

Keywords: lamotrigine, capillary electrophoresis, human plasma, hollow fiber liquid-phase microextraction, dispersive liquid-liquid microextraction.

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Epilepsia 1
1.2 Lamotrigina 2
1.3 Técnicas de microextração 7
1.3.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) 7
1.3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) 10
2. OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo geral 15
2.2 Objetivos específicos 15
3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS 17
3.1 Equipamentos 17
3.2 Reagentes e solventes 17
3.3 Capilar 18
3.4 Soluções padrão de LTG e lidocaína 18
3.5 Avaliação das condições para análise da LTG por CE 19
3.6 Amostras de plasma 20
3.7 Aspectos éticos do estudo 20
3.8 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários com epilepsia 20
3.9 Preparo das amostras de plasma 20
3.10 HF-LPME 21
3.11 DLLME 23
3.12 Validação do método analítico 24
3.12.1 Linearidade 25
3.12.2 Precisão, exatidão e LIQ 25
3.12.3 Seletividade 26
3.12.4 Efeito residual 26
3.12.5 Estabilidade 27

3.13 Cálculo da recuperação **28**
3.14 Aplicação do método **28**
3.15 Comparação dos métodos **29**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **31**
4.1 Avaliação das condições para análise da LTG por CE **31**
4.1.1 Condicionamento do capilar 31
4.1.2 Composição, concentração e pH do BGE 32
4.1.3 Efeito da tensão aplicada 36
4.1.4 Efeito da temperatura 37
4.1.5 Efeito do tempo de injeção da amostra 38
4.1.6 Pré-concentração *online* – *Stacking* mediado por força iônica 39
4.1.7 Condições estabelecidas 41
4.1.8 Depleção do BGE 42
4.2 Avaliação da HF-LPME para análise da LTG em plasma **43**
4.2.1 Efeito do solvente orgânico na fibra 44
4.2.2 Efeito do tempo de agitação 45
4.2.3 Efeito da velocidade de agitação da amostra 46
4.2.4 Efeito do pH da fase doadora 47
4.2.5 Efeito do pH da fase aceptora 48
4.2.6 Efeito s*alting out* 48
4.2.7 Condições estabelecidas para a HF-LPME 49
4.3 Validação do método analítico **50**
4.3.1 Linearidade 50
4.3.2 Precisão, exatidão e LIQ 50
4.3.3 Seletividade 51
4.3.4 Efeito residual 52
4.3.5 Estabilidade 52
4.3.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos 53
4.4 Avaliação da DLLME para análise da LTG em plasma **54**
4.4.1 Pré-tratamento da amostra por precipitação proteica 55
4.4.2 Efeito do pH da fase aquosa 57
4.4.3 Efeito do tipo de solvente extrator 58
4.4.4 Efeito do volume do solvente extrator 59
4.4.5 DLLME assistida por *vortex* e ultrassom 60

4.4.6 Efeito *salting out* na amostra 61
4.4.7 Condições estabelecidas para extração da LTG por DLLME 62
4.5 Validação do método analítico.....62
4.5.1 Linearidade e LIQ 62
4.5.2 Precisão e exatidão 63
4.5.3 Seletividade 64
4.5.4 Efeito residual 64
4.5.5 Estabilidade 65
4.5.6 Determinação da LTG em amostras de plasma de pacientes epilépticos .65
4.6 Análise estatística dos pacientes nos métodos da HF-LPME e DLLME ...66
4.7 Comparação entre HF-LPME e DLLME 67
5. CONCLUSÃO 70
Referencias.....72
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.....81

Introdução

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação"
(Simone de Beauvoir)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela predisposição a geração de crises epilépticas. Estas crises são ocorrências transientes e imprevisíveis de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal e excessiva (FISHER et al., 2005). A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (MOSHÉ et al., 2015) e sua etiologia pode ser classificada em: genética, quando as crises são resultado direto de um defeito genético; estrutural/metabólica, que envolvem lesões do tipo derrame, traumatismo e infecção; ou de causa desconhecida (BERG et al., 2010). Os pacientes com essa desordem podem sofrer discriminação, falta de compreensão de outras pessoas e dificuldade de viver com uma doença imprevisível que pode comprometer as atividades diárias (MOSHÉ et al., 2015).

As crises epilépticas podem ser englobadas em três categorias principais denominadas generalizadas, focais ou desconhecidas. As crises generalizadas são caracterizadas por início rápido, com comprometimento da rede de neurônios de ambos os hemisférios cerebrais (BERG et al., 2010) e perda imediata da consciência como uma de suas características mais marcantes (RANG et al., 2008); as crises focais ocorrem em apenas um dos hemisférios cerebrais, entretanto, podem abranger mais de uma rede de neurônios e, consequentemente, gerar mais de um tipo de crise, porém cada qual possui seu próprio sítio de iniciação da crise (BERG et al., 2010) e as crises desconhecidas, que são assim chamadas por não haver evidências suficientes para caracterizar a crise como focal ou generalizada (MOSHÉ et al., 2015). Elas podem diferir entre si de acordo com a localização onde são desencadeadas no cérebro, padrões de propagação, maturidade cerebral, medicamentos usados pelos pacientes, dentre outros fatores. Essas crises podem afetar as funções motoras, sensoriais e/ou autônomas, bem como a consciência, estado emocional, memória, cognição e/ou comportamento. É importante lembrar que nem todos os tipos de crise afetam todas essas funções, mas influenciam em pelo menos uma delas (FISHER et al., 2005). Os sintomas podem ganhar a forma de um breve lapso de atenção à convulsão com duração de alguns minutos, bem como sensações ou comportamentos estranhos (RANG et al., 2008).

O diagnóstico da epilepsia é crítico, pois dificilmente um paciente tem uma crise epiléptica no primeiro contato com o médico, desse modo, o relato de parentes sobre os sintomas apresentados no momento da crise é de grande importância (OGUNI, 2004). Juntamente com esses relatos, o diagnóstico da epilepsia está relacionado com o histórico pessoal e familiar, sintomas apresentados, idade em que surgem as crises e estado cognitivo e neurológico do paciente (MOSHÉ et al., 2015). Além disso, exames podem auxiliar no diagnóstico, como o eletroencefalograma, para identificar a atividade neurológica anormal, tomografia computadorizada e ressonância magnética para determinação de anormalidades cerebrais (OGUNI, 2004).

O tratamento é comumente feito com fármacos antiepilépticos que visam inibir a descarga neuronal anômala, mas não conseguem corrigir a causa subjacente, sendo eficazes em controlar cerca de 75% dos casos (RANG et al., 2008). Esses fármacos são escolhidos de acordo com o tipo de crise, idade e sexo do paciente, efeitos adversos apresentados, potencial de interação medicamentosa, dentre outros fatores (MOSHÉ et al., 2015). 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 fármaco antiepiléptico 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 efeitos adversos (PUCCI; RAGGI, 2005). Por exemplo, há a necessidade do aumento da dose da LTG quando o paciente se encontra em tratamento com carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e/ou primidona, pois estes são indutores enzimáticos (LANÇAS; SOZZA; QUEIROZ, 2003). Além do tratamento com fármacos antiepilépticos, a cirurgia também pode ser realizada em casos graves e especiais (MOSHÉ et al., 2015). Sendo assim, o tratamento deve ser realizado com base nos riscos e benefícios ao paciente (OGUNI, 2004).

1.2 Lamotrigina

Atualmente, há vários fármacos antiepilépticos que podem ser usados no controle das crises epiléticas. A carbamazepina, a fenitoína, o ácido valpróico, o fenobarbital, a primidona e a etossuximida são exemplos dos primeiros

antiepilépticos empregados na terapia e ainda continuam em uso (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). Já a lamotrigina (LTG), o felbamato, a gabapentina, o topiramato, a tiagabina, a oxcarbazepina, o levetiracetam, a zonisamida e a pregabalina foram lançados no início dos anos 90 e fazem parte dos antiepilépticos de segunda geração, e, mais recentemente, foram lançadas a lacosamida e a rufinamida, de terceira geração (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009). A procura por novos fármacos antiepilépticos tem por objetivo promover a segurança do seu uso, com menos efeitos adversos, menos interações medicamentosas e que possam ser empregados em monoterapia (ST. LOUIS; ROSENFELD; BRAMLEY, 2009).

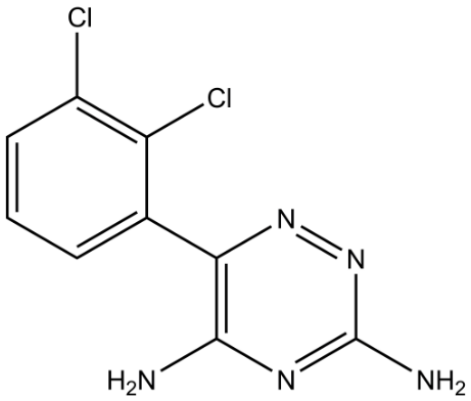

Figura 1 - Estrutura química da LTG

A LTG (Figura 1) é um fármaco pertencente à classe das feniltriazinas (PUCCI et al., 2005). É eficaz no tratamento de crises epilépticas generalizadas e focais, no tratamento adjunto da epilepsia refratária (PUCCI et al., 2005; KIM et al., 2015), pode ser empregada como estabilizador de humor em pacientes com transtorno bipolar (SARACINO et al., 2007; MORGAN et al., 2011; KIM et al., 2015; NIKOLAOU et al., 2015) e no tratamento da síndrome de Lennox-Gastaut (KIM et al., 2015; MOSHÉ et al., 2015). Além disso, estudos demonstraram que a LTG pode ser eficaz no tratamento a dependência de cocaína, álcool e inalantes (ZALEWSKA-KASZUBSKA et al., 2015).

A LTG é comercializada sob a denominação de Lamictal, é quimicamente designada como 6-(2,3 diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina, apresenta a fórmula molecular $C_9H_7N_5Cl_2$ e massa molar de 256,09 g mol^{-1}. Apresenta-se sob a forma de um pó com coloração que varia do branco ao creme. Possui valor de pKa de 5,7, é

pouco solúvel em solução de ácido clorídrido 0,1 mol L^{-1} (4,1 mg mL^{-1} a 25°C) e pouco solúvel em água (0,17 mg mL^{-1} a 25°C) (Food and Drug Administration, 2005). O valor de seu coeficiente de partição (log P) octanol:água é 1,19 em pH 7,6 (DICKINS; CHEN, 2002).

O seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, porém, provavelmente, sua ação ocorre devido ao bloqueio dos canais de sódio voltagem dependente (BRODIE et al., 2011; SARACINO et al., 2007; CHENG; CHOU; HU, 2005): o fármaco interage com esses canais mantendo-os inativados por mais tempo, o que reduz a capacidade dos neurônios de disparar em alta frequência (MCNAMARA, 2007) devido à inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios (BRODIE et al., 2011; SARACINO et al., 2007) como glutamato e aspartato (CHENG; CHOU; HU, 2005).

Sua administração é por via oral e os comprimidos estão disponíveis nas dosagens de 25, 100, 150 e 200 mg (Food and Drug Administration, 2005). A dose diária varia entre 25 a 400 mg (PUCCI et al., 2005). A faixa de concentração plasmática não é bem definida, alguns autores relatam que concentrações entre 1 – 4 µg mL^{-1} são mais comuns, porém em alguns casos concentrações acima de 10 µg mL^{-1} são observados (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; SARACINO et al., 2007; NIKOLAOU et al., 2015; KIM et al., 2015). O pico de concentração plasmática ocorre entre 1 a 5 horas após administração oral (SARACINO et al., 2007; KIM et al., 2015) e cerca de 55% é ligada às proteínas plasmáticas (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; NIKOLAOU et al., 2015). Sua biodisponibilidade é de 98%, apresenta absorção linearmente relacionada à dose (cinética linear) e não é afetada pela presença de alimentos (PUCCI et al., 2005). Sua meia-vida plasmática é de aproximadamente 25 horas, a qual pode ser aumentada para 60 horas na presença de inibidores enzimáticos como o ácido valpróico, ou diminuída para 15 horas na presença de indutores enzimáticos como a carbamazepina, a fenitoína e o fenobarbital (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002). Sua biotransformação é extensivamente realizada via glucuronidação hepática pela uridina 5’-difosfato-glicuronil transferase (UGT1A4) (CHENG; CHOU; HU, 2005; NIKOLAOU et al., 2015) e dá origem ao seu principal metabólito, lamotrigina 2-N-glucuronido, o qual é inativo (SARACINO et al., 2007) e sua eliminação é renal (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002; NIKOLAOU et al., 2015).

A incidência de toxicidade está relacionada ao aumento significante das concentrações séricas acima de 15 µg mL^{-1} (ALDAZ et al., 2011). Os efeitos adversos mais observados relacionados ao tratamento com a LTG em monoterapia são tontura, ataxia, sonolência, dor de cabeça, diplopia, visão borrada, náusea, vômito e *rash* cutâneo (SARACINO et al., 2007; HEYMAN et al., 2012).

Devido à alta variabilidade interindividual (SARACINO et al., 2007), às interações medicamentosas (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 20022) e aos efeitos adversos apresentados, o desenvolvimento de metodologias confiáveis, rápidas e simples é importante para realizar a monitorização terapêutica da LTG em plasma de pacientes em tratamento para ajuste de dose individual e evitar os efeitos adversos (THEURILLAT; KUHN; THORMANN, 2002).

Alguns métodos já foram descritos na literatura para a quantificação da LTG (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 sequencial (LC-MS/MS do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*), cromatografia gasosa (GC do inglês, *gas chromatography*), eletroforese capilar (CE do inglês*, capillary electrophoresis*) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*). 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, a LLE apresenta algumas desvantagens como tendência à formação de emulsão, baixo potencial de automação, necessita de uma grande quantidade de solventes orgânicos de alta pureza, os quais são caros e tóxicos, o que gera resíduos perigosos (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; WILLE; LAMBERT, 2007). Já na SPE há a necessidade do uso de cartuchos que são caros, apresenta problemas na reprodutibilidade devido à diferença entre os lotes de adsorventes (WILLE; LAMBERT, 2007), utiliza altas quantidades de solventes (da ordem de mililitros) e durante o processo com amostras reais o cartucho pode sofrer entupimento (MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011).

Tabela 1 - Análise da LTG em amostras biológicas

Autores	Técnica de análise	Tipo de extração	Matriz	Volume da amostra	Limite de quantificação
Shihabi; Oles, 1996	CE e HPLC	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	0,5 µg mL^{-1}
Theurillat; Kuhn; Thormann, 2002	CE	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	<1 µg mL^{-1}
Zheng et al., 2004	CE-MS	Precipitação proteica	Plasma	100 µL	0,1 µg mL^{-1}
Pucci et al., 2005	MEKC	SPE	Plasma e urina	250 µL	1 µg mL^{-1}
Saracino et al., 2007	HPLC	Precipitação proteica	Plasma	150 µL	0,1 µg mL^{-1}
Hotha et al., 2011	LC-MS/MS	LLE	Plasma	100 µL	2 ng mL^{-1}
Morgan et al., 2011	HPLC	LLE	Plasma	50 µL	0,1 µg mL^{-1}
Shibata et al., 2012	LC-MS/MS	Precipitação proteica	Plasma	50 µL	1,2 µg mL^{-1}
Nikolaou et al., 2015	GC	SPE	Sangue total	200 µL	0,5 µg mL^{-1}

Assim, devido às desvantagens das técnicas mais tradicionais de preparo de amostra, as pesquisas nesta área tem 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 o desenvolvimento de procedimentos menos danosos ao meio ambiente sem perder o compromisso com a eficiência de extração. Baseado nisso, nos últimos anos as microextrações em fase líquida (LPME do inglês, *liquid-phase microextraction*) vem ganhando espaço no cenário da química analítica, entre elas: a microextração em gota suspensa (SDME do inglês, *sigle drop microextraction*), a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME do inglês, *hollow-fiber liquid-phase*

microextraction) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*) (ASENSIO-RAMOS, et al., 2011).

A SDME é baseada na distribuição do analito entre a fase orgânica (a gota suspensa) e a fase aquosa que contém o analito. Apesar dessa técnica apresentar simplicidade e eficiência, a gota suspensa se torna um problema porque muitas vezes ela pode ser perdida na fase aquosa, o que dificulta a otimização do procedimento. Na HF-LPME o solvente se encontra dentro dos poros da fibra e a fase aceptora no lúmen da fibra, o que permite agitação da amostra sem perda das fases, além das fibras poderem ser descartadas devido ao baixo custo. A DLLME consiste na injeção de uma mistura de solvente extrator e dispersor na amostra aquosa com a formação do ponto nuvem, e sedimentação do analito juntamente com o solvente extrator (HAN; ROW, 2012). Neste projeto foram avaliadas a HF-LPME e a DLLME como técnicas de preparo de amostra. Assim, serão descritos a seguir os conceitos teóricos de ambas as técnicas.

1.3 Técnicas de microextração

1.3.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

Em 1999, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen inovaram o procedimento de microextrações em fase líquida com a introdução de fibras ocas constituídas de polipropileno, para a extração de metanfetamina a partir de amostras de urina e plasma. Desde então, a HF-LPME vem sendo considerada uma evolução dentre as técnicas de microextração em fase líquida por visar o uso reduzido da razão solvente orgânico/ fase aquosa (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A HF-LPME consiste na impregnação dos poros de uma fibra capilar porosa e hidrofóbica (fibra cilíndrica oca) com o solvente orgânico de extração e o preenchimento do seu lúmen com microlitros de uma fase aceptora (RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008).

Devido à sua versatilidade, essa 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 o analito é extraído da amostra aquosa diretamente para solvente orgânico que se encontra tanto nos poros da fibra quanto no seu lúmen.

Esse processo é ilustrado abaixo (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$\text{Analito}_{\text{(fase doadora)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase aceptora orgânica)}}$$

O modo de duas fases é mais adequado para compostos com alta solubilidade em solventes orgânicos (ARCE et al., 2009). A fase aceptora proveniente do modo de duas fases pode ser diretamente analisada por GC (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010), CE se houver compatibilidade com o eletrólito de corrida ou pode ser evaporada e reconstituída para posterior análise (ARCE et al., 2009; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

No modo de 3 fases o analito é extraído de uma amostra aquosa através do solvente orgânico presente nos poros da fibra, passando para uma solução aquosa presente no lúmen da mesma. Esse modo é limitado para compostos com grupos funcionais ionizáveis com certo grau de hidrofobicidade (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010). Esse processo é ilustrado abaixo (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$\text{Analito}_{\text{(fase doadora)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase orgânica)}} \rightleftharpoons \text{Analito}_{\text{(fase aceptora aquosa)}}$$

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

Em ambos os modos, a eficiência da extração depende do coeficiente de partição do analito entre as fases citadas acima. Assim, um alto fator de enriquecimento pode ser obtido, e calculado pela equação 1 (HO; PEDERSEN-BJERGAAR; RASMUSSEN, 2002):

$$E = \frac{V_d \; x \; R}{100 \; x \; V_a} \qquad \text{(equação 1)}$$

Na qual E corresponde ao fator de enriquecimento (E inglês, *enrichment factor*), V_d é o volume da fase doadora, R é a recuperação e V_a é o volume da fase aceptora orgânica ou aquosa, dependendo do modo de extração empregado.

Independente 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 (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006). Posto isso, em relação à eficiência da extração, a mesma é dependente da partição do composto entre: fase doadora $\rightleftharpoons$ solvente orgânico $\rightleftharpoons$ fase aceptora aquosa ou orgânica (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Vários parâmetros podem ser avaliados para melhorar a eficiência de extração do método. Dentre eles, a escolha do solvente orgânico adequado é primordial. Esse solvente precisa ser insolúvel em água para garantir que seja formado um filme na parede da fibra e, além disso, esse solvente deve ser compatível com a fibra para que seus poros sejam preenchidos completamente (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010). Vários solventes orgânicos têm sido utilizados para impregnar a fibra, como éter diexílico, -*n*-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol (DE OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, devido à fase orgânica atuar como uma barreira entre as fases aceptora e doadora, impedindo o contato entre essas duas fases (DE OLIVEIRA et al., 2008), é possível aplicar agitação constante durante a extração sem a perda da fase aceptora (ARCE et al., 2009; RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 2004).

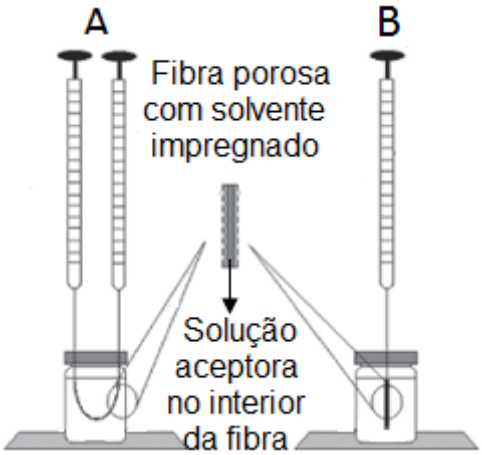

Figura 2 - HF-LPME empregando configuração em “U” (A) e “haste” (r*od-like*) (B) (adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008)

Para realização da extração, a HF-LPME pode ser empregada em duas configurações principais: configuração em "U" (Figura 2A), onde as extremidades da fibra são conectadas a duas ponteiras por onde a fase aceptora é colocada e retirada, e configuração tipo "haste" (*rod-like*) (Figura 2B), onde uma das

extremidades é fechada e a outra é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; ARCE et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2008).

As vantagens dessa técnica são: em virtude do baixo custo das fibras, não é necessária a sua reutilização o que evita problemas de efeito residual (DE OLIVEIRA et al., 2008; RASMUSSEN; PERDERSEN-BJERGAARD, 1999) e, devido ao diminuído tamanho dos poros da fibra, moléculas grandes são impossibilitadas de atravessar para a fase aceptora (CHA; MYUNG, 2013). Além disso, em apenas um passo, essa técnica combina extração, concentração e limpeza da amostra (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011) o que a torna uma técnica de extração adequada para amostras complexas (CHA; MYUNG, 2013) como o plasma. Ainda, a quantidade de solvente orgânico necessária para impregnar a fibra é normalmente entre 5 – 30 µL (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008) o que corresponde a uma pequena quantidade de solvente orgânico e, consequentemente, diminui a exposição à substâncias tóxicas (CARRÃO et al., 2011). Devido a essa pequena quantidade de solvente orgânico utilizada, atualmente essa técnica é bastante atrativa devido aos princípios da química verde, que tem como base o desenvolvimento sustentável. Um dos conceitos da química verde é a diminuição da produção de resíduos químicos e, consequentemente, diminuição de seu descarte (LENARDÃO et al., 2003). As principais limitações estão relacionadas à dificuldade de extração de analitos altamente polares, entretanto essa situação pode ser contornada com a adição de par-iônico na amostra, e a necessidade do uso de solventes orgânicos com alto ponto de ebulição e imiscíveis em água o que limita a seletividade do método (DE OLIVEIRA et al., 2008).

1.3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi desenvolvida por Rezaee et al. em 2006 para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água. É uma técnica de extração que consiste no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases de extração (fase aquosa, solvente dispersor e solvente extrator) e é ideal para a extração de compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de distribuição alterado pelo controle do pH (analitos ácidos ou alcalinos) (ZANG et al., 2009). A razão entre o volume de fase extratora e fase doadora é muito baixa se comparada a outras técnicas (OJEDA; ROJAS, 2009)

e o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente devido à utilização de um sistema ternário de solventes: amostra aquosa, solvente dispersor miscível tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa e solvente orgânico extrator de alta densidade (ZANG et al., 2009; DIONÍSIO et al., 2010).

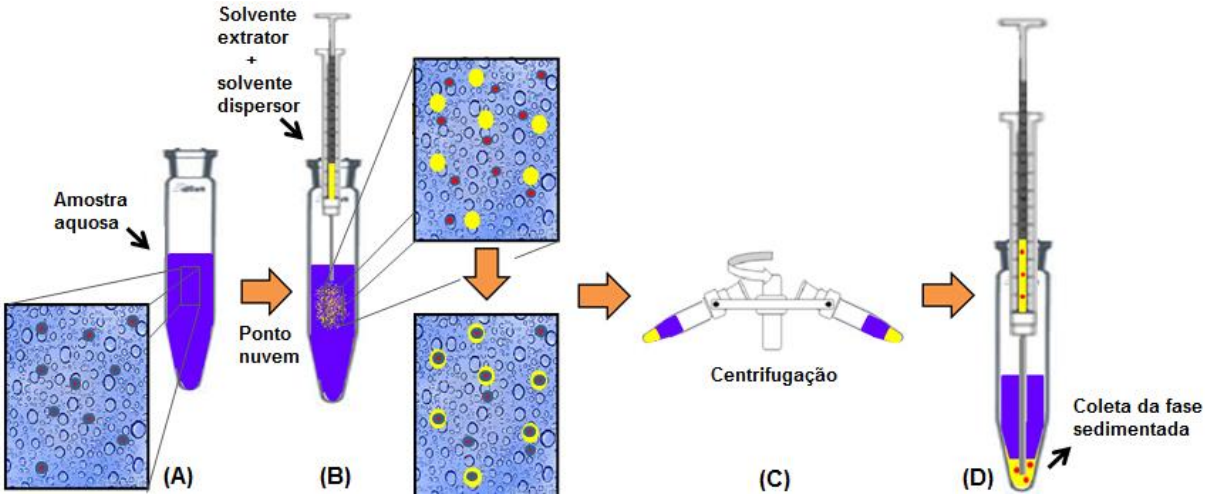

Figura 3 - Procedimento da DLLME (adaptado de FORTES, 2013)

A Figura 3 apresenta o sistema ternário de solventes. A extração acontece quando, com ajuda de uma seringa, a mistura solvente extrator/dispersor é injetada de maneira rápida e forte em um tubo contendo a fase aquosa (amostra) (A). Instantaneamente é formada uma nuvem promovida pela dispersão do solvente extrator na fase aquosa (favorecida pelo solvente dispersor), formando microgotas dispersas por toda a amostra, com grande área superficial, onde ocorre a partição do analito (B) (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). Assim, o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, sendo uma das vantagens desta técnica. Além disso, a razão entre o volume de fase aceptora e de fase doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente, o que permite a obtenção de altos valores de enriquecimento (REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009; HUO et al., 2011). Após a formação do ponto nuvem é realizada a centrifugação, onde as microgotas do solvente extrator e analito são depositadas no fundo do tubo cônico, formando a fase sedimentada (C), que é retirada e analisada (D) (REZAEE, 2006; ZANG et al., 2009).

Os solventes dispersores são escolhidos devido a sua capacidade de miscibilidade tanto no solvente extrator quanto na fase aquosa. Essa característica permite a dispersão do solvente extrator em partículas finas na fase aquosa, de modo que a área superficial do solvente extrator em contato com a fase aquosa, a

qual contém o analito, seja infinitamente grande, o que promove o aumento da eficiência de extração. Os solventes mais utilizados para essa função são o metanol, a acetonitrila e a acetona (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Os solventes extratores são selecionados com base na sua capacidade de extração e, preferencialmente por apresentarem densidade maior que a da água. Os solventes extratores mais utilizados (da ordem de microlitros) são o clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno (REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009; HUO et al., 2011). Outros solventes não halogenados também podem ser usados como 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-dodecanol e n-hexadecano (OJEDA; ROJAS, 2009).

Além da escolha dos solventes e o volume adequado de cada um deles, outros parâmetros importantes a serem estudados na DLLME são o pH e força iônica da amostra e o tempo de extração (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). Na DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura dos solventes na amostra e a centrifugação. Uma vez que a área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa é infinitamente grande, a transferência do analito para o solvente orgânico é quase instantânea, então o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente e o tempo de extração é muito curto (REZAEE et al., 2006). Desse modo, vários autores consideram que o tempo de extração não é um fator significativo (REZAEE et al., 2006; REZAEI et al., 2008; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008; CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010). Além disso, estudos tem mostrado aumento na eficiência de extração utilizando a DLLME assistida por *vortex* (ZHANG; LEE, 2012) ou ultrassom (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Para avaliação da eficiência de extração desses parâmetros, a recuperação e o fator de enriquecimento podem ser calculados de acordo com as equações 2 e 3 (REZAEE et al., 2006):

$$E = \frac{C_{sed}}{C_0} \qquad \text{(equação 2)}$$

Onde E é o fator de enriquecimento, C_{sed} é a concentração do analito na fase sedimentada e C_0 é a concentração inicial do analito.

$$R = \frac{C_{sed}\ x\ V_{sed}}{C_0\ x\ V_{aq}} \qquad \text{(equação 3)}$$

Onde R é a recuperação da extração (do inglês *extraction recovery*), V_{sed} é o volume da fase sedimentada e $\mathrm{V_{aq}}$ é o volume da amostra aquosa.

As vantagens desta técnica incluem simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento (ZANG et al., 2009; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; OJEDA; ROJAS, 2009; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). As desvantagens são: uso de solventes tóxicos (ALSHANA et al., 2013; RAJABI et al., 2014), todo o processo de extração é manual e a centrifugação é a etapa que demanda maior tempo no processo (REZAEI et al., 2008; FARAJZADEH et al., 2010; BERIJANI et al., 2006; ZAREI; GHOLAMIAN, 2011).

A DLLME é uma técnica de extração muito utilizada para a análise de amostras aquosas. Porém, várias publicações já relataram seu uso para análise de alimentos, frutas, vegetais, assim como amostras biológicas e ambientais (ANDRUCH et al., 2012). Todavia, para realização da DLLME em amostras complexas como o plasma, um pré-tratamento da matriz como precipitação proteica, ultrafiltração, diluição e centrifugação é necessário (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011).

Objetivos

"Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose correta diferencia o veneno do remédio".

(Paracelsus)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar duas técnicas de microextração (HF-LPME e DLLME) para determinação da LTG por CE em amostras de plasma de pacientes em tratamento atendidos pelo Serviço de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (SAT-FCFRP/USP).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise da LTG por CE;
- Desenvolver um método para análise da LTG em amostra de plasma utilizando a HF-LPME;
- Validar o método desenvolvido de acordo com os guias da Anvisa e EMA;
- Aplicar o método em amostras de plasma de pacientes em tratamento e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP;
- Desenvolver um método para análise da LTG em amostra de plasma utilizando a DLLME;
- Validar o método desenvolvido de acordo com os guias da Anvisa e EMA;
- Aplicar o método em amostras de plasma de pacientes em tratamento e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP;
- Comparar as duas técnicas de microextração para análise da LTG em amostras de plasma.

Conclusão

"Lord, we ain't what we oughta be.
We ain't what we want to be.
We ain't what we gonna be.
But, thank God, we ain't what we was."
(Martin Luther King, Jr.)

5. CONCLUSÃO

Este trabalho descreveu pela primeira vez o desenvolvimento e validação de duas técnicas de microextração em fase líquida, HF-LPME e DLLME, para a determinação da LTG em plasma de pacientes epilépticos por CE.

Primeiramente, as condições eletroforéticas foram otimizadas e então empregadas em todas as amostras subsequentes do estudo. A CE mostrou-se eficiente na análise da LTG juntamente com o PI, com tempo de migração da LTG por volta de 6 minutos. As técnicas de microextração em fase líquida, HF-LPME e DLLME, foram desenvolvidas e avaliadas de acordo com o melhor desempenho de recuperação da LTG. Após as condições ótimas de extração serem estabelecidas, os métodos foram validados de acordo com os guias da Anvisa e EMA, e os parâmetros de desempenho analítico apresentaram resultados satisfatórios. A etapa prática final consistiu na aplicação dos dois métodos em amostras de plasma de pacientes epiléticos em tratamento com LTG e atendidos pelo SAT-FCFRP/USP. Todas as amostras foram positivas e estavam dentro da faixa de concentração plasmática abrangida por esse estudo, o que faz com que ambos os métodos possam ser empregados na rotina.

Por fim, foi realizada uma comparação entre as duas técnicas de microextração. Em relação à HF-LPME, essa se mostrou mais vantajosa devido a baixa quantidade de solvente orgânico utilizado (por volta de 30 µL por amostra), facilidade e menor tempo de preparo, e maior valor de recuperação da LTG. Em relação à DLLME, essa se mostrou uma extração mais laboriosa com a necessidade de etapas de pré-tratamento, centrifugação e evaporação das amostras, além do uso de solventes orgânicos clorados. Portanto, a HF-LPME é uma técnica promissora para análise de rotina em matrizes complexas, com reduzido consumo de solvente orgânico, além da possibilidade de automação.

Referências

Referencias

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanáliticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012.

ALDAZ, A.; FERRIOLS, R.; AUMENTE, D.; CALVO, M. V.; FARRE, M. R.; GARCÍA, B.; MARQUÉS, R.; MAS, P.; PORTA, B.; OUTEDA, M.; SOY, D. Pharmacokinetic monitoring of antiepileptic drugs. **Farm Hosp**. v. 35, n. 6, p. 326-339, 2011.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; GUPTA; V. K. Precision in capillary electrophoresis. **Anal Lett**. v. 39, n. 11, p. 2345-2357, 2006.

ALSHANA, U.; LUBBAD, I.; GÖĞER, N. G.; ÇOK, I.; TAMER, U.; ERTAŞ, N. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Combined with Counter-Electroosmotic Flow Normal Stacking Mode in Capillary Electrophoresis for the Determination of Bisphenol a in Water and Urine Samples. **J Liq Chromatogr Relat Technol.** v. 36, n. 20, p. 2855-2870, 2013.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: Human Press. 1996. 349 p.

ANDRUCH, V.; BALOGH, I.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J. Five Years of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Appl Spectrosc.** v. 48, n. 3, p. 161-259, 2012.

ARCE, L.; NOZAL, L.; SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis. **Trends Analyt Chem**. v. 28, n. 7, p. 842-853, 2009.

ASENSIO-RAMOS, M.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **J Chromatogr A**. v. 1218, n. 42, p. 7415-7437, 2011.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**. v. 1016, n. 1, p. 11-20, 2003.

BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE , M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; BOAS, W.V.E.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; NORDI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Comission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**. v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M. R.; AGHAEE, E. 'Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography-Flame Photometric Detection. Very Simple, Rapid and Sensitive Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Water. **J Chromatogr A.** v. 1123,

n. 1, p. 1-9; 2006.

BRODIE, M.J.; COVANIS, A.; GIL-NAGEL, A.; LERCHE, H.; PERUCCA, E.; SILLS, G.J.; WHITE, H.S. Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter? **Epilepsy & behavior**. v. 21, n. 4, p. 331-341, 2011.

BUENO, J. S.; SILVA, B. J. G.; M. E. C. QUEIROZ. Enantioselective Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma Samples by Protein Precipitation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 22, n. 7, p. 1221-1228, 2011.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Anal Chim Acta.** v.665, n. 1, p. 55-62, 2010.

CARRÃO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; DE OLIVEIRA, A. R. 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.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quím 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.

Chemicalize. Ionização da lamotrigina disponível em <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=lamotrigine&source=fp>. Acesso em 01 fev de 2016.

CHENG C. L.; CHOU, C. H.; HU, O. Y. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B.** v. 817, n. 2, p. 199-206, 2005.

DE ALBUQUERQUE, N. C.; de GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. A new and fast DLLME-CE method for the enantioselective analysis of zopiclone and its active metabolite after fungal biotransformation. **J Pharm Biomed Anal**. v. 109, p. 192-201, 2015.

DE GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Capillary electromigration techniques for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices: a critical appraisal. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 12, p. 229-245.

DE MORAES, M. L. L.; DE MORAES, S.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Quim Nova.** v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim Nova**. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

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**. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 900, p. 48-58, 2012.

DICKINS, M.; CHEN, C. Lamotrigine: chemistry, biotransformation and pharmacokinetics. In: LEVY, R. H.; MATTSON, R. H.; MELDRUM B. S.; PERUCCA, E. (Ed.). **Antiepileptic Drugs.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. cap 35, p. 370-379. Disponível em <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 31 Jan. 2014.

DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B. DOS; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida, **Scientia Chromatographica.** v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

DOLAN, J. W. **Peak tailing and resolution.** Local: 2002. Disponível em: < http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/8dbc54e4-8988-4615-91dc-b0c394633f89/article-19199.pdf>. Acesso em: 06 Jan. 2016.

EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y.; FIROZJAEI, H. A.; KAMAREI, F.; TAVASSOLI, N.; ROUINI, M. R. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of gabapentin in biological samples. **Anal Chim Acta**. v. 665, n. 2, p. 221-226, 2010.

EMÍDIO, E. S.; de MENEZES PRATA, V.; de SANTANA, F. J.; DÓREA, H. S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **J Chromatogr B**. v. 878, n. 24, p. 2175-2183, 2010.

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. **Anal Chim Acta.** v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guiderline on bioanalytical method validation. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em 01 fev de 2016.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D. J.; BAKHTIYARI, R. F. Use of a Capillary Tube for Collecting an Extraction Solvent Lighter Than Water after Dispersive Liquid-Liquid

Microextraction and Its Application in the Determination of Parabens in Different Samples by Gas Chromatography--Flame Ionization Detection. **Talanta.** v. 81, n. 4-5, p. 1360-1367, 2010.

FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, C.; PENA, M. T.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Anal Chim Acta**. v. 767, p. 88-96, 2013.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **J Appl Toxicol.** v. 35, n. 4, p. 418-425, 2015.

FISHER, R.S.; BOAS, W.V.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J JR. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**. v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Lamictal**: lamotrigine, prescribing information. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020241s037s038,020764s030s031lbl.pdf>. Acesso em: 02 Jan. 2016.

FORTES, S. S. Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina. 2013. 103 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; REUBSAET, J. L. E.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry Rapid screening of amphetamines from biological matrices. **J Sep Sci**. v. 24, n. 7, p. 615–622, 2001.

HAN, D.; ROW, K. H. Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples. **Microchim Acta**, v. 176, p. 1–22, 2012.

HEYMAN, E.; LAVIE, R.; LAHAT, E.; BRAUNSTEIN, R.; BAR-HAIM, A.; BERKOVITCH, M.; GANDELMAN-MARTON, R. Lamotrigine serum concentration in children with epilepsy. **Pediatr Neurol**. v. 47, n. 6, p. 427-430, 2012.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAAR, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction. **J Chromatogr A**. v. 963, n. 1-2, p. 3-17, 2002.

HOTHA, K. K.; KUMAR, S. S.; BHARATI, D. V.; VENKATESWARULU, V. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. **Biomed Chromatogr.** v. 26, n. 4, p. 491-496, 2011.

HUO X, LI Q, LIN X, CHEN X, BI K. Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Six Fungicides in Fruit Samples by GC-ECD, **Chromatographia**. v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 2011.

JOUYBAN, A.; SOROURADDIN, M. H.; FARAJZADEH, M. A.; SOMI, M. H.; FAZELI-BAKHTIYARI, R. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 134, p. 681-689, 2015.

KIM, H. J.; KIM, T. E.; JOO, E. Y.; SEO, D. W.; LEE, S. Y.; HONG, S. B. Effect of comedication on lamotrigine clearance in Korean epilepsy patients. **Clin Chim Acta**, v. 438, p. 269-273, 2015.

KUBÁÑ, P.; SEIMAN, A.; KALJURAND, M. Sampling and quantitative analysis in capillary electrophoresis. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 3, p. 41-65.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis principles and practice**. Germany: Springer-Verlag, 1993. 370 p.

LANÇAS F. M.; SOZZA M. A., QUEIROZ, M. E. Simultaneous plasma lamotrigine analysis with carbamazepine, carbamazepine 10,11 epoxide, primidone, phenytoin, phenobarbital, and PEMA by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). **J Anal Toxicol.** v. 27, n. 5, p. 304-308, 2003.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**. v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. J **Chromatogr A**. v. 902, n. 1, p. 17-63, 2000.

MAGALHÃES, I. R. S., BONATO, P. S. Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma. **Anal Bioanal Chem.** v. 393, p. 1805-1813, 2009.

MAHAM, M.; KIAROSTAMI, V.; WAQIF-HUSAIN, S.; SHARIFABADI, M. K. Analysis of chlorpheniramine in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Scielo**. v. 50, n. 3, p. 551-557, 2014.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **J Chormatogr A.** v. 907, n. 1-2, p. 21-37, 2001.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman:** as bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. cap. 19. p. 447-468.

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

MORGAN, P. E.; FISHER, D. S.; EVERS, R.; FLANAGAN, R. J. A rapid and simple assay for lamotrigine in serum/plasma by HPLC, and comparison with an immunoassay. **Biomed Chromatogr.** v. 25, p. 775-778, 2011.

MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; RYVLIN, P.; TOMSON, T. Epilepsy: new advances. **The Lancet**, v. 385, p. 884–98, 2015.

NAEENI, H. N.; YAMINI, Y.; REZAEE, M. Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. **J Supercrit Fluids**. v. 57, n. 3, p. 219-226, 2011.

NIKOLAOU, P.; PAPOUTSIS, I.; DONA, A.; SPILIOPOULOU, C.; ATHANASELIS, S. Development and validation of a GC/MS method for the simultaneous determination of levetiracetam and lamotrigine in whole blood. **J Pharm Biomed Anal.** v. 102, p. 25-32, 2015

OGUNI, H. Diagnosis and treatment of epilepsy. **Epilepsia**. v. 45, n. 8, p. 13-16, 2004.

OJEDA, C B.; ROJAS, F.S. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: a review. **Chromatographia**. v. 69, n. 11-12, p. 1149-1159, 2009.

PAWLISZYN, J.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical microextraction: current status and future trends. **J Chromatogr Sci**. v. 44, n. 6, p. 291-307, 2006.

PERDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Anal Chem**. v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999.

PERDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **J Chromatogr A**. v. 1184, n. 1-2, p. 132-142, 2008.

PERLATTI, B.; CARRILHO, E.; AGUIAR, F. A. Sample stacking: a versatile approach for analyte enrichment in CE and microchip-CE. In: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (Ed.). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis.** 1st ed. New Jersey: Wiley, 2013. cap. 2, p. 23-40.

PUCCI, V.; BUGAMELLI, F.; BACCINI, C.; RAGGI, M. A. Analysis of lamotrigine and its metabolites in human plasma and urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Electrophoresis**. v. 26, n. 4-5, p. 935-942, 2005.

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.

RAJABI, M.; HAJI-ESFANDIARI, S.; BARFI, B.; GHANBARI, H. Ultrasound-Assisted Temperature-Controlled Ionic-Liquid Dispersive Liquid-Phase Microextraction Method for Simultaneous Determination of Anethole, Estragole, and Para-Anisaldehyde in Different Plant Extracts and Human Urine: A Comparative Study. **Anal Bioanal Chem.** v. 406, n. 18, p. 4501-4512, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos antiepilépticos. In:_____. **Rang & Dale:** Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsivier, 2008. cap. 40, p. 575 – 587.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Analyt Chem.** v. 23, p. 1-10, 2004.

REIJENGA, J. C.; VERHEGGEN, T. P. E. M.; MARTENS, J. H. P. A.; EVERAERTS, F. M. Buffer capacity, ionic strength and heat dissipation in capillary electrophoresis. **J Chromatogr A.** v.744, n.1-2, p. 147–153, 1996.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **J Chromatogr A**. v. 1216, n. 9, p. 1511-1514, 2009.

REZAEE, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M. R.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J Chromatogr A**. v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method. **J Chromatogr A.** v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

REZAEI, F.; BIDARI, A.; BIRJANDI, A. P.; MILANI HOSSEINI, M. R.; ASSADI, Y. Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Determination of Polychlorinated Biphenyls in Water. **J Hazard Mater**. v. 158, n. 2-3, p. 621-627, 2008.

ROZET, E.; RUDAZ, S.; MARINI, R. D.; ZIÉMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, Ph. Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. **Anal Chim Acta**. v. 702, n. 2, p. 160-171, 2011.

SARACINO, M. A.; BUGAMELLI, F.; CONTI, M.; AMORE, M.; RAGGI, M. A. Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma. **J Sep Sci.** v. 30, n. 14, p. 2249-2255, 2007.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trends Analyt Chem.** v. 29, n. 1, p. 1-14, 2010.

SARAJI, M; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. **Anal Bioanal Chem**. v. 406, n. 8, p. 2027-2066, 2014.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K.; BIDGOLI, A. A. H. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Anal Bioanal Chem**. v. 400, n. 7, p. 2149-2158, 2011.

SHIBATA, M.; HASHI, S.; NAKANISHI, H.; MASUDA, S.; KATSURA, T.; YANO, I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. **Biomed Chromatogr.** v. 26, n. 12, p. 1519-1528, 2012.

SHIHABI, Z. K.; OLES, K. S. Serum lamotrigine analysis by capillary electrophoresis. **J Chromatogr B**, v. 683, p. 119-123, 1996.

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. K.; ROSENFELD, W. E.; BRAMLEY, T. Antiepileptic drug monotherapy: the initial approach in epilepsy management. **Curr Neuropharmacol**. v. 7, n. 2, p. 77-82, 2009.

STEINER, S.A.; FRITZ, J. S. Separation of organic cations using novel background electrolytes by capillary electrophoresis. **J Chromatogr A**. v.1192, n.1, p. 152–156, 2008.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTE, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Sci Int.** v. 92, n. 2, p. 75-88,1998.

THEURILLAT, R; KUHN, M.; THORMANN, W. Therapeutic drug monitoring of lamotrigine using capillary electrophoresis. Evaluation of assay performance and quality assurance over a 4-year period in the routine arena. **J Chromatogr A.** v. 979, n. 1-2, p. 353-368, 2002.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. 2. Ed. New York: Academic Press, 2000. 462 p.

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

YAZDI, A. S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S. R. Separation and Determination of Amitriptyline and Nortriptyline by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography Flame Ionization Detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p.1293-1299, 2008.

ZALEWSKA-KASZUBSKA, J.; BAJER, B.; GORSKA, D.; ANDRZEJCZAK, D.; DYR, W.; BIENKOWSKI, P. Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol preferring rats chronically treated with lamotrigine. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 7-12, 2015.

ZANG, X.H.; WU, Q.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chin J Anal Chem**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009.

ZAREI, A. R.; GHOLAMIAN, F. Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid in Pharmaceutical Formulation and Biological Samples, **Anal Biochem**, v. 412, n. 2, p.224-228, 2011.

ZHANG, Y.; LEE, H. K. Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **J Chromatogr A**. v. 1249, p. 25-31, 2012

ZHENG, J.; JANN, M. W.; HON, Y. Y.; SHAMSI, S. A. Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2033-2043, 2004.

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. 005/2013
kms

Ribeirão Preto, 20 de março de 2013.

À Pós-graduanda
Luiza Saldanha Ribeiro Barros
Orientadora: Profª. Drª. Cristiane Masetto de Gaitani
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 113ª reunião ordinária realizada em 14.03.2013, o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DE MICROTÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE LAMOTRIGINA EM PLASMA DE PACIENTES EPILÉPTICOS POR ELETROFORESE CAPILAR**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 284.**

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP 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.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 – Fax: (16) 3602-4892