

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Luiz Philip Lopes Costa

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE PREPARO DE  
AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE BIXINA E METFORMINA EM  
PLASMA DE RATO POR UHPLC-DAD-MS/MS**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1210<sup>a</sup>

D. 668<sup>a</sup>

Luiz Philip Lopes Costa

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE PREPARO DE  
AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE BIXINA E METFORMINA EM  
PLASMA DE RATO POR UHPLC-DAD-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Departamento  
de Química do Instituto de Ciências Exatas  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Química – Química  
Analítica

Belo Horizonte

2017

C837a Costa, Luiz Philip Lopes  
2017 Avaliação de diferentes técnicas de preparo de  
D amostras para determinação de bixina e metformina em  
plasma de rato por UHPLC-DAD-MS/MS / Luiz Philip Lopes  
Costa. 2017.

[x],75 f. : il.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.

Coorientador: Rubén Dario Sinisterra Millan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

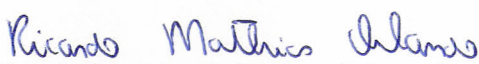
1. Química analítica - Teses 2. Preparação de  
amostra (Química) - Teses 3. Medicamentos - Análise -  
Teses 4. Cromatografia líquida - Teses I. Orlando,  
Ricardo Mathias, Orientador II. Sinisterra Millán,  
Rubén Dario, Coorientador III. Título.

CDU 043

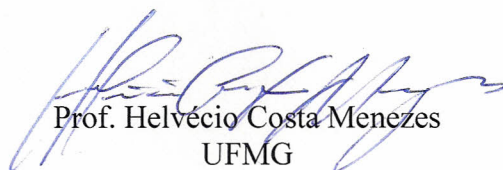
**"Avaliação de Diferentes Técnicas de Preparo de Amostras para Determinação de Bixina e Metformina em Plasma de Rato por UHPLC-DAD-MS/MS"**

**Luiz Philip Lopes Costa**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador  
UFMG

  
Prof. Guilherme Dias Rodrigues  
UFMG

  
Prof. Helvécio Costa Menezes  
UFMG

Belo Horizonte, 27 de março de 2017.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe Ecy, meus irmãos João Paulo e Polianne por sempre estarem ao meu lado nessa jornada;

Ao meu Pai, Orácio, por sempre ter me dado incentivo aos estudos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Orlando pela paciência, pelos ensinamentos e pelo incentivo ao longo do caminho percorrido;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ruben pela parceria neste trabalho;

À Dr<sup>a</sup>. Cyntia pelos ensinamentos;

Ao técnico de laboratório Zezé que sempre esteve disponível quando precisava de amostra;

Aos amigos dos laboratórios LAMS e LEMB pelos momentos de alegria compartilhados neste tempo;

Aos amigos de república e os amigos de viçosa que vivem em BH pelos bons momentos;

Aos amigos de Sete Lagoas pelo companheirismo;

À Pós-graduação do departamento de química e à UFMG pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela infraestrutura;

Aos funcionários do departamento de química pelo suporte;

Aos professores pelos ensinamentos;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

À todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para realização deste trabalho e para formação do conhecimento;

Meu muito obrigado.

## Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos sendo um para bixina, por extração líquido-líquido, e outro para metformina, por precipitação proteica, ambos extraídos de amostras de plasma de rato.

Devido à complexidade da composição do plasma, faz-se necessário o uso de técnicas de preparo de amostra para eliminação de interferentes e/ou pré-concentração. A extração líquido-líquido foi utilizada para extração de bixina com posterior análise por cromatografia líquida de ultra eficiência associada a um sistema de detecção por absorvância com arranjo de fotodiodos e posterior espectrometria de massa sequencial (UHPLC-DAD-MS/MS). A precipitação proteica foi empregada na extração da metformina que foi analisada, por sua vez, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS).

Os métodos desenvolvidos para bixina e para metformina foram validados e foram obtidos valores de exatidão por ensaio de recuperação próximo de 103 e 102%, respectivamente. A precisão obtida em termos de coeficiente de variação foi de 10% para ambos os compostos. O limite de quantificação foi de  $40 \text{ ng mL}^{-1}$  para a bixina e  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  para a metformina com coeficiente de variação de 15 e 13%, respectivamente. A faixa linear de trabalho foi de  $200\text{-}2200 \text{ ng mL}^{-1}$  para a bixina e  $5\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$  para metformina.

Os resultados obtidos são coerentes com a literatura, permitindo a extração e posterior análise dos compostos a partir de uma matriz complexa, no caso plasma de rato. Além disso, os volumes de amostra utilizados na extração líquido-líquido da bixina foram inferiores aos encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** bixina, metformina, plasma, extração líquido-líquido, precipitação proteica, cromatografia líquida de ultra eficiência.

## Abstract

In this work, two methods, one for bixin, by liquid-liquid extraction, another one for metformin, by protein precipitation, both extracted from samples of rat plasma, were developed and validated.

Due to the complexity of the plasma composition, it was necessary to use sample preparation techniques to eliminate interferents and/or preconcentrate. The liquid-liquid extraction was used to extract bixin with subsequent analysis by ultra-high performance liquid chromatography associated to an absorbance with photodiode array detector and subsequent sequential mass spectrometry (UHPLC-DAD-MS/MS). Protein precipitation was employed in the extraction of metformin, which was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

The methods developed for bixin and for metformin were validated and accuracy values were obtained per recovery experiment near 103 and 102%, respectively. The precision obtained, in terms of coefficient of variation, was 10% for both compounds. The quantification limit was  $40 \text{ ng mL}^{-1}$  for bixin and  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  for metformin with a coefficient of variation of 15 and 13%, respectively. The linear range of work was 200-2200  $\text{ng mL}^{-1}$  for bixin and 5-500  $\text{ng mL}^{-1}$  for metformin.

The results obtained are consistent with the literature, allowing the extraction and subsequent analysis of the compounds from a complex matrix, in the rat blood plasma. In addition, the sample volumes used in the liquid-liquid extraction of bixin are lower than those found in the literature.

**Key words:** bixin, metformin, plasma, liquid-liquid extraction, protein precipitation, liquid chromatography

## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química da molécula de bixina. ....	1
Figura 2: Proposta da biossíntese de bixina a partir do licopeno por transformações enzimáticas [1, 2]. ....	2
Figura 3: Estrutura química da metformina. ....	4
Figura 4: Esquema das diferentes etapas envolvidas nos preparo de amostras por precipitação proteica. ....	8
Figura 5: Esquema das diferentes etapas envolvidas em uma extração líquido-líquido. ....	10
Figura 6: Esquema da extração em fase sólida. 1) etapa de condicionamento em que um solvente é percolado pelo cartucho. 2) etapa de aplicação da amostra. 3) etapa de lavagem ou limpeza em que os interferentes são eliminados do sorvente. 4) etapa de eluição em que os analitos de interesse são removidos do cartucho. ....	15
Figura 7: Sistema cromatográfico composto por fase móvel, bomba de alta pressão, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados. ....	20
Figura 8: Sistema do espectrômetro de massas composto por entrada da amostra, fonte de ionização, analisador, detector e sistema de aquisição de dados. ....	23
Figura 9: Estrutura da metformina e fragmentos do íons monitorados. ....	44
Figura 10: Estrutura da bixina e fragmentos dos íons monitorados. ....	45
Figura 11: Cromatograma das injeções de solução padrão de metformina(A) ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por espectrometria de massas sequencial ( $m/z 130 \rightarrow 60$ ), solução padrão de bixina (B) ( $2500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por absorvância com detector com arranjo de fotodiodos e solução padrão de bixina (C) ( $2500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por espectrometria de massas ( $m/z 395 \rightarrow 363$ ). ....	46
Figura 12: Cromatograma da injeção de solução padrão de bixina ( $2200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com destaque para o espectro de absorção no tempo de retenção (4,57 min). ....	47
Figura 13: Avaliação do tipo de agente precipitante (ATCA, acetona e acetonitrila) na porcentagem de extração de metformina em amostras de plasma. ....	49
Figura 14: Avaliação do teor de agente precipitante (5, 10 e 15% m/v) na porcentagem de extração de metformina em amostras de plasma. ....	50
Figura 15: Cromatogramas demonstrando a distorção no formato do pico da metformina após a extração por precipitação proteica empregando o agente precipitante ácido tricloroacético em diferentes concentrações (5, 10 e 15%, m/v). ....	51
Figura 16: Avaliação do tipo de solvente extrator (éter dietílico, diclorometano, hexano e éter dietílico:acetonitrila/5:2) na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido. ....	52
Figura 17: Avaliação da diluição do plasma na porcentagem de extração de bixina na extração líquido-líquido. Sem diluição = sem diluição dos $400 \mu\text{L}$ de plasma com água deionizada; diluição 100 = $400 \mu\text{L}$ de plasma diluído com $100 \mu\text{L}$ de água deionizada; diluição 200 = $400 \mu\text{L}$ de plasma diluído com $200 \mu\text{L}$ de água deionizada. ....	53
Figura 18: Avaliação do tempo de agitação na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido. ....	54

Figura 19: Avaliação do efeito da adição de NH <sub>4</sub> Ac (acetato de amônio)(20%, m/v), NaCl (20%, m/v) e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%, m/v) no plasma na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido.....	55
Figura 20: Avaliação do número de extração na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido. ....	56
Figura 21: Avaliação do efeito do tipo de sorvente empregado na porcentagem de extração de bixina de amostras de plasma empregando a extração em fase sólida. ....	57
Figura 22: Avaliação do efeito da massa de sorvente na porcentagem de extração de bixina de amostras de plasma empregando a extração em fase sólida.....	58
Figura 23: Avaliação do efeito da adição de sal na etapa de diluição do plasma e <i>clean up</i> na porcentagem de extração de bixina em amostra de plasma empregando a extração em fase sólida. SA = sem adição de sal; S01 = adição de sal na diluição do plasma; S02 = Adição de sal da diluição do plasma e na etapa de <i>clean up</i> ; S03 = adição de sal na etapa de <i>clean up</i> .....	59
Figura 24: Avaliação de diferentes sistemas de eluição na extração de bixina em amostrsa de plasma empregando a extração em fase sólida. E1: 2 x 600µL ACN:éter dietílico (1:1, v/v); E2: 1 x 400 µL ACN; E3: 1 x 600µL ACN:éter dietílico (1:1, v/v) + 1 x 600 µL éter dietílico; E4: 1 x 400 µL ACN + 1 x 600 µL éter dietílico. ....	60
Figura 25: Cromatogramas da injeção de bixina (2200 ng mL <sup>-1</sup> ) adicionado em um extrato de plasma e um extrato de branco de plasma. O espectro Uv-Vis foi adquirido no comprimento de onda de 459 nm.....	61
Figura 26: Cromatogramas da metformina (500 ng mL <sup>-1</sup> ) com detecção por espectrometria de massas sequencial (m/z 130→60) adicionado em um extrato de plasma e um extrato de branco de plasma. ....	61

## Lista de tabela

Tabela 1: Sorvente utilizados em extração em fase sólida. ....	15
Tabela 2: Comparação das técnicas, colunas, fases móveis e preparo de amostra utilizadas na análise de metformina e bixina.....	22
Tabela 3: Especificações das colunas cromatográficas avaliadas. ....	29
Tabela 4: Proporções dos agentes precipitantes avaliados na extração de metformina em amostras de plasma. ....	29
Tabela 5: Grupos de condições avaliadas no estudo do efeito da adição de sal na porcentagem de extração da bixina por SPE. ....	37
Tabela 6: Sistemas de eluição avaliados na etapa de eluição para a extração da bixina de amostras de plasma por SPE.....	39
Tabela 7: Parâmetros cromatográficos de separação obtidos nas diferentes colunas cromatográficas avaliadas. ....	48
Tabela 8: Parâmetros da validação da bixina e metformina. Curva de calibração, faixa linear, coeficiente de correlação e limite de quantificação. ....	62
Tabela 9: Valores de precisão para bixina e metformina. ....	62
Tabela 10: Valores de recuperação da exatidão para bixina e metformina.....	63

## Abreviaturas

APCI	Ionização química à pressão atmosférica ( <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica ( <i>Atmospheric pressure photoionization</i> )
DAD	Detector por arranjo de diodos ( <i>Diodo array detector</i> )
DESI	Ionização de dessorção por eletronebulização ( <i>Desorption electrospray ionization</i> )
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva ( <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> )
EI	Impacto de elétrons ( <i>Electron impact</i> )
ELL	Extração líquido-líquido
ESI	Ionização por eletronebulização ( <i>Electrospray ionization</i> )
FAB	Ionização por bombardeamento de átomos rápidos ( <i>Fast atom bombardment ionization</i> )
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca ( <i>Hollow fiber liquid phase microextraction</i> )
HILIC	Cromatografia líquida com interação hidrofílica ( <i>Hydrophilic interaction chromatography</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
m/z	Relação massa carga
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MS	Espectrometria de massas ( <i>Mass spectrometry</i> )
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial ( <i>Mass spectrometry/mass spectrometry</i> )
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida ( <i>Matrix solid phase dispersion</i> )
RMN	Ressonância magnética nuclear
SDME	Microextração em gota única ( <i>Single drop microextraction</i> )
SPE	Extração em fase sólida ( <i>Solid phase extraction</i> )
SPME	Microextração em fase sólida ( <i>Solid phase microextraction</i> )
UHPLC/UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência ( <i>Ultra high performance liquid chromatography</i> )
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## **Sumário**

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de tabela</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Bixina</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Metformina</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Sistemas de liberação controlada</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4. Técnicas de preparo de amostra para extração de fármacos em     flúidos biológicos</b> .....	<b>6</b>
1.4.1. Precipitação protéica.....	7
1.4.2. Extração líquido-líquido.....	9
1.4.3. Extração em fase sólida.....	13
<b>1.5. Técnicas de preparo de amostra empregadas para a determinação     de bixina, metformina e compostos correlatos</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6. Cromatografia líquida na determinação de fármacos em flúidos     biológicos</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7. Espectrometria de massas na determinação de fármacos em flúidos     biológicos</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Objetivo Geral</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1. Reagentes e soluções</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. Equipamentos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3. Amostras</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4. Parâmetros cromatográficos</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5. Parâmetros da espectrometria de massa</b> .....	<b>28</b>

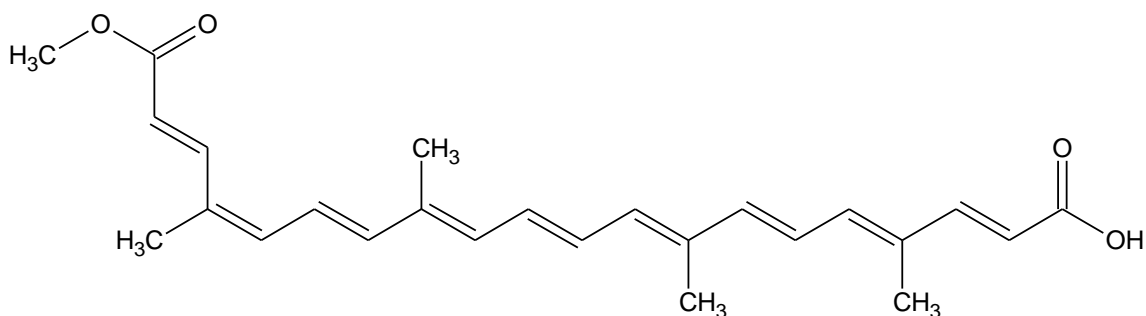
<b>3.6. Avaliação das colunas cromatográficas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7. Avaliação dos parâmetros de precipitação proteica para extração de metformina de amostras de plasma .....</b>	<b>29</b>
3.7.1. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina de amostras de plasma	29
3.7.2. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina de amostras de plasma	30
<b>3.8. Otimização da extração líquido-líquido para extração de bixina de amostras de plasma .....</b>	<b>31</b>
3.8.1. Avaliação do tipo de solvente extrator na extração de bixina de amostras de plasma	31
3.8.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra de plasma na extração de bixina .....	32
3.8.3. Avaliação do tempo de agitação entre a amostra de plasma e o solvente extrator na extração de bixina .....	32
3.8.4. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma na extração de bixina .....	33
<b>3.9. Otimização da extração em fase sólida para extração de bixina de amostras de plasma .....</b>	<b>35</b>
3.9.1. Avaliação do tipo de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma .....	35
3.9.2. Avaliação da massa de sorvente na extração de bixina .....	36
3.9.3. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma e na etapa de limpeza sobre a extração de bixina .....	37
3.9.4. Avaliação do solvente de eluição na extração de bixina.....	38
<b>3.10. Determinação dos parâmetros de validação do método .....</b>	<b>40</b>
3.10.1. Condições cromatográficas para determinação de bixina.....	40
3.10.2. Condições cromatográficas para determinação de metformina.....	41
3.10.3. Seletividade .....	41
3.10.4. Linearidade e faixa linear de trabalho.....	42
3.10.5. Exatidão .....	42
3.10.6. Precisão .....	42
3.10.7. Limite de quantificação .....	43
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>44</b>

<b>4.1.Otimização das condições cromatográficas, arranjo de diodo e espectrometria de massas.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.Avaliação das colunas cromatográfica.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.Avaliação dos parâmetros para extração de metformina por precipitação proteica .....</b>	<b>48</b>
4.3.1. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina .....	48
4.3.2. Otimização da concentração do ácido tricloroacético na extração de metformina	50
<b>4.4.Otimização da extração líquido-líquido para extração de bixina nas amostras de plasma .....</b>	<b>51</b>
4.4.1. Avaliação do tipo de solvente extrator na extração de bixina .....	51
4.4.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra de plasma na extração da bixina .....	52
4.4.3. Avaliação do tempo de agitação entre a amostra de plasma e o solvente extrator na extração da bixina .....	53
4.4.4. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma na extração da bixina .....	54
4.4.5. Extração líquido-líquido sequencial na determinação de bixina .....	55
<b>4.5.Otimização da extração em fase sólida para extração de bixina de amostras de plasma .....</b>	<b>56</b>
4.5.1. Avaliação do tipo de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma .....	56
4.5.2. Avaliação da massa de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma....	57
4.5.3. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma e na etapa de limpeza sobre a extração de bixina .....	58
4.5.4. Avaliação do solvente de eluição na extração de bixina.....	59
<b>4.1.Determinação das figuras de mérito de validação do método .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>64</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Anexo I.....</b>	<b>75</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Bixina

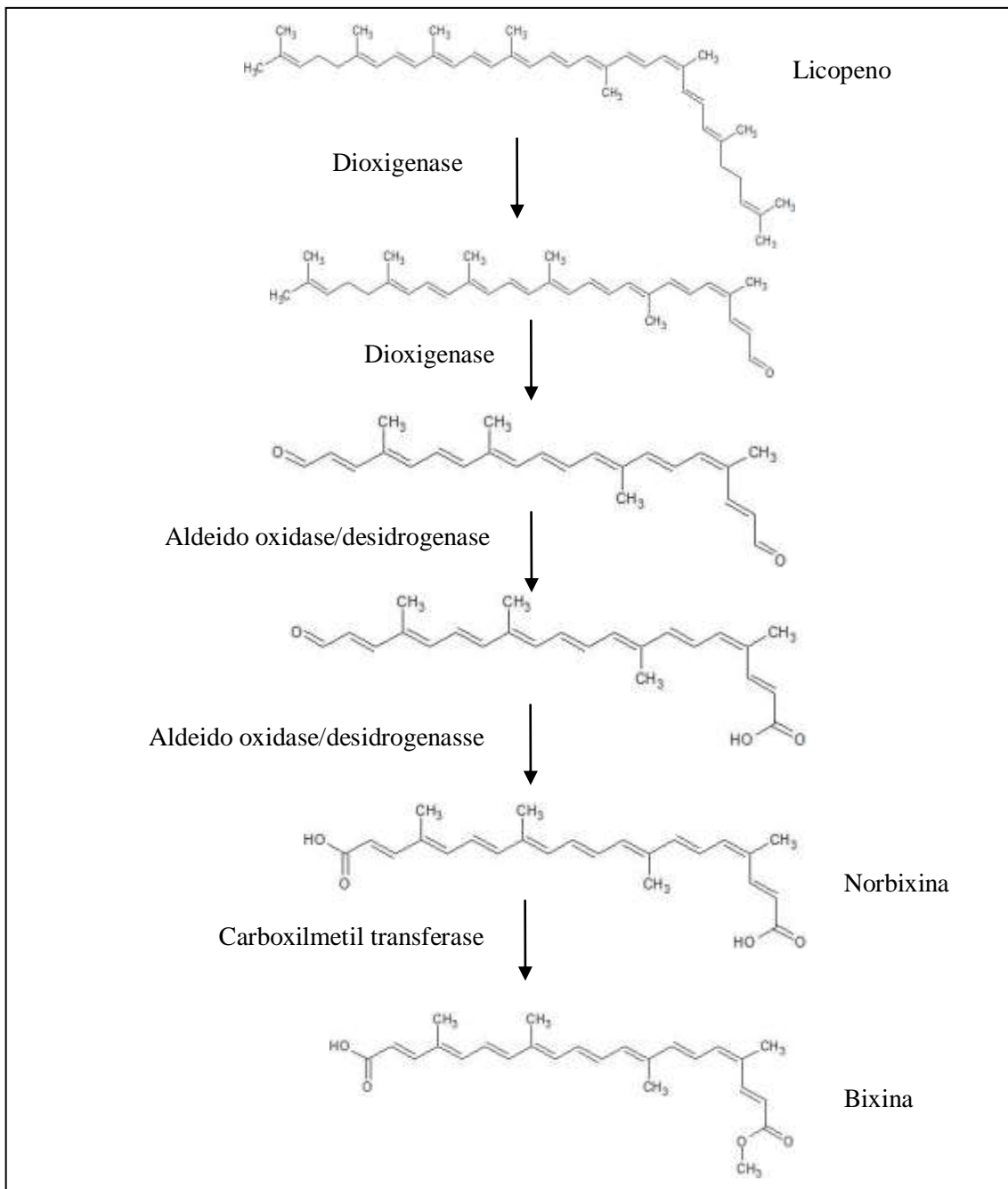
A bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno- 6,6'-dioato,  $C_{25}H_{30}O_4$ , massa molar  $394,5 \text{ g mol}^{-1}$ , Figura 1) é um composto presente na casca da semente do urucum proveniente do fruto do urucuzeiro (*Bixa orellana L*). A árvore do urucum é normalmente encontrada em regiões tropicais como o centro e sul da América, Ásia e África [3]. Dos corantes naturais utilizados em alimentos, a bixina derivada da semente do urucum corresponde a 50% dos corantes naturais utilizados no setor alimentício [4]. Esse corante (E160b) é bastante utilizado para colorir diversos alimentos, tais como óleo, sorvete, manteiga, queijos, pães, embutidos e cereais [5].



**Figura 1:** Estrutura química da molécula de bixina.

O pigmento extraído da semente do urucum é constituído por vários carotenoides, em que a bixina é o componente majoritário sendo ele um apocarotenoide predominantemente de estrutura na forma cis [3]. Os primeiros relatos do isolamento da bixina datam de 1875, apesar da sua estrutura ter sido elucidada somente em 1961 com auxílio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear [6, 7]. A bixina possui em uma extremidade da sua estrutura uma carboxila e uma metil carboxila (éster) na outra extremidade. Entre as carbonilas há nove duplas ligações conjugadas e quatro metilas ligadas a sua cadeia principal. Essa estrutura confere à bixina alta lipossolubilidade, sendo amplamente solúvel em diversos solventes orgânicos. A cis-bixina é solúvel em diversos solventes orgânicos, porém não é solúvel em óleo vegetal. Quando aquecido, ocorre a isomerização para a trans-bixina que é mais estável e solúvel em óleo vegetal [3]. Apesar de pouco conhecido, a biossíntese da bixina começa de um carotenoide

bastante conhecido, o licopeno. O licopeno sofre varias reações enzimáticas oxidativas, transformando-se em um apocarotenoide (Figura 2)[1, 2, 8].



**Figura 2:**Proposta da biossíntese de bixina a partir do licopeno por transformações enzimáticas [1, 2].

### 1.1.1. Propriedades físico-químicas

A bixina possui um hidrogênio ionizável com pka obtido por cálculos teóricos de 4,79 [9]. Seu ponto de fusão é 198 °C e o sistema de duplas ligações conjugadas faz

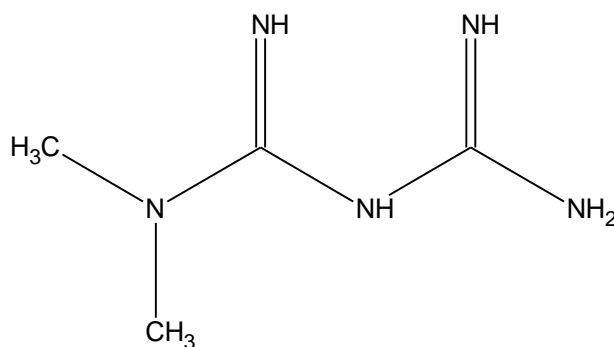
com que essa molécula possua absorção apreciável na região do visível do espectro eletromagnético sendo o máximo de absorbância em clorofórmio observado em 503, 469 e 439 nm. Este composto é fracamente solúvel em água, porém plenamente solúvel em acetona, clorofórmio e soluções aquosas básicas [10].

### **1.1.2. Propriedades farmacológicas da bixina**

A bixina é um composto natural capaz de combater diversas enfermidades. Silva e colaboradores[11] verificaram a eficácia da bixina em reduzir o número de aberrações cromossômicas e inibir o aumento da peroxidação lipídica. Em um estudo em que foram avaliados corantes alimentícios naturais frente à proliferação celular, foi constatado que a bixina foi hábil na inibição de células tumorais humanas de câncer de colón, sistema nervoso central, estômago e células pulmonares. Observou-se também que a bixina possui ação anti-inflamatória [12]. Tibodeau e colaboradores[13] investigaram a ação da bixina sobre células de mieloma múltiplo e averiguou-se que a cis-bixina foi eficiente na atividade anti-mieloma. Em outros estudos Rohers e colaboradores observaram em 2014 que os níveis de glicose em sangue de rato diminuem na presença de bixina tanto quanto a metformina que é um fármaco de referência e amplamente conhecido com agente antihiperlipidêmico[14]. Em 2015 Somacal e colaboradores verificaram que a bixina possui a capacidade de combater lesões ateroscleróticas em ratos com dieta hipercolesterômicas, provavelmente devido a sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória[15]. Também foi averiguado que a bixina foi capaz de reduzir a gordura visceral e massa corporal [16]. Em um estudo realizado por Anantharaman e colaboradores em 2016 foi verificado que a bixina possui capacidade inibitória da atividade da tirosinase em células de melanoma[17]. Recentemente, Pinzón-García e colaboradores desenvolveram e patentearam uma nanofibra de bixina suportada em um polímero biodegradável que demonstrou ser um material promissor quando empregado como curativos, uma vez que a nanofibra foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas de ratos diabéticos [18]. Em 2010 pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa patentearam uma pomada, a base de extrato do urucum, de uso tópico e oral para o auxílio na cicatrização da epiderme e das mucosas[19].

## 1.2. Metformina

A metformina (1,1-dimetilbiguanida,  $C_4H_{11}N_5$ , MM 129,1 g mol<sup>-1</sup>, Figura 3) é um fármaco da classe das biguanidas que possuem cinco nitrogênios intercalados com carbonos em uma cadeia curta. A guanidina, precursor das biguanidas, é o composto ativo presente na *Galega officinalis* [20]. A metformina assim como as outras guanidinas são compostos utilizados como agentes no combate da diabetes mellitus tipo 2.



**Figura 3:** Estrutura química da metformina.

### 1.2.1. Propriedades físico-químicas

A metformina é um composto básico com pKa = 12,4 [21], fazendo com que sua permeabilidade na célula seja limitada dado seu elevado grau de ionização, lipofobicidade e sua carga positiva. O cloridrato de metformina é um pó branco, cristalino, sem cheiro característico, com características amargas, higroscópico e ponto de ebulição entre 222-226 °C. Possui alta solubilidade em água, baixa em etanol e praticamente insolúvel em solvente orgânico como acetona, éter etílico e clorofórmio[22]. Este composto não possui cromóforos importantes na estrutura da molécula sendo 233 nm o comprimento de onda de máxima absorção da metformina.

### 1.2.2. Propriedades farmacológicas da metformina

Apesar de ser bastante utilizado como agente no combate à diabetes é conhecido o uso da metformina em outras enfermidades como, por exemplo, a síndrome metabólica, síndrome do ovário policístico, hirsutismo além de ser empregada como regulador do ciclo menstrual [22].

Esse composto é considerado um agente antihiperlipidêmico por reduzir os níveis de glicose no sangue. Alguns estudos demonstram que a metformina atua na diminuição da produção de glicose hepática, seja ela pela inibição da glicogênese hepática por modificação da atividade enzimática ou por diminuição da captação hepática de substratos glicogênicos [21].

O cloridrato de metformina é a principal forma como o medicamento é consumido e nessa apresentação ela possui uma absorção lenta e incompleta pela parte superior do intestino delgado, sendo a biodisponibilidade do comprimido de 50-60%. O tempo de meia vida é de aproximadamente de 6 horas com pico máximo de concentração de 1-3 horas. Seu efeito pode durar até duas semanas sendo sua eliminação realizada majoritariamente por via renal. A interação proteína-metformina é insignificante, fazendo com que o fármaco esteja na forma livre quando presente na circulação sanguínea [22].

### **1.3. Sistemas de liberação controlada**

Os sistemas de dosagem de medicamentos convencionais são sistemas que liberam medicamentos em uma dose única ou múltiplas doses sequenciais. Uma grande limitação desses sistemas é a baixa capacidade em manter as concentrações plasmáticas do medicamento dentro da faixa compreendida entre o limiar tóxico e o limiar subterapêutico. Devido ao risco de intoxicações em doses únicas ou ao inconveniente em se utilizar múltiplas doses de medicamentos, para manter a concentração plasmática em níveis adequados, sistemas de liberação prolongada são preferidos ou mesmo necessários, com a intenção de reduzir as intoxicações e diminuir o número de doses. Com o uso de sistema de liberação controlada há, frequentemente, um menor acúmulo de medicamento no organismo visto que à medida que o fármaco é liberado ele é consumido, diminuindo tanto o acúmulo como a excreção de medicamento inalterado e não utilizado. A diminuição do metabolismo e excreção do princípio ativo pelos órgãos metabolizadores e excretadores também constitui uma das vantagens dos sistemas de liberação, uma vez que o fármaco não está totalmente em sua forma livre. Para os sistemas de liberação controlada utilizam-se de preferência polímeros biocompatíveis, não cancerígenos, não alergênicos e quimicamente inertes [23, 24].

Um dos principais sistemas de liberação de fármacos são as nanopartículas poliméricas. As nanopartículas poliméricas são sistemas em que o princípio ativo fica retido no núcleo da nanoesfera revestida por um polímero ou pode ser incorporada a matriz polimérica. O fármaco pode ser liberado por meio da difusão, em que ele penetra na camada polimérica formando uma gradiente de concentração ou pelo rompimento dessa camada [24]. Os sistemas de liberação baseados em bicamadas lipídicas são os lipossomas que são vesículas capazes de encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos devido as suas camadas lipofílica e hidrofílica [25, 26]. Os dendrímeros são sistemas baseados em estrutura polimérica nanométricas com múltiplas ramificações [27, 28].

Os sistemas de liberação controlada podem ser utilizados em tratamento de doenças como câncer [29-33], Parkinson [34], asma [35] e herpes genital [36, 37]. O sistema criado por Pinzón-García e colaboradores consistiu de uma nanofibra de policaprolactona incorporada com bixina que foi desenvolvida para aplicação em feridas de ratos diabéticos [18].

#### **1.4. Técnicas de preparo de amostra para extração de fármacos em fluidos biológicos**

A etapa de preparo de amostra é uma das etapas envolvidas no procedimento analítico. Essa etapa é de extrema importância porque visa isolar o analito da matriz, realizar uma limpeza de interferentes e, quando possível, pré-concentrar o composto de interesse. Devido à importância da análise química, o tempo gasto na etapa de preparo de amostra em um procedimento analítico torna-se cada vez maior [38]. Hoje em dia, diversas técnicas de preparo de amostras podem ser empregadas em preparo de amostra, que vão desde as técnicas mais comuns como as tradicionais, extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e precipitação proteica (PP). Outras técnicas mais recentemente desenvolvidas também são amplamente empregadas incluindo a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), microextração sortiva em barra de agitação (SBSE), microextração em gota única (SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), preparo de amostra empregando meios de acesso restritos, polímeros de impressão molecular, entre outras. Devido à necessidade de análises cada vez mais rápida e grandes volumes de amostras, técnicas de preparo de amostra automatizadas vêm sendo desenvolvidas. Com a automação dos

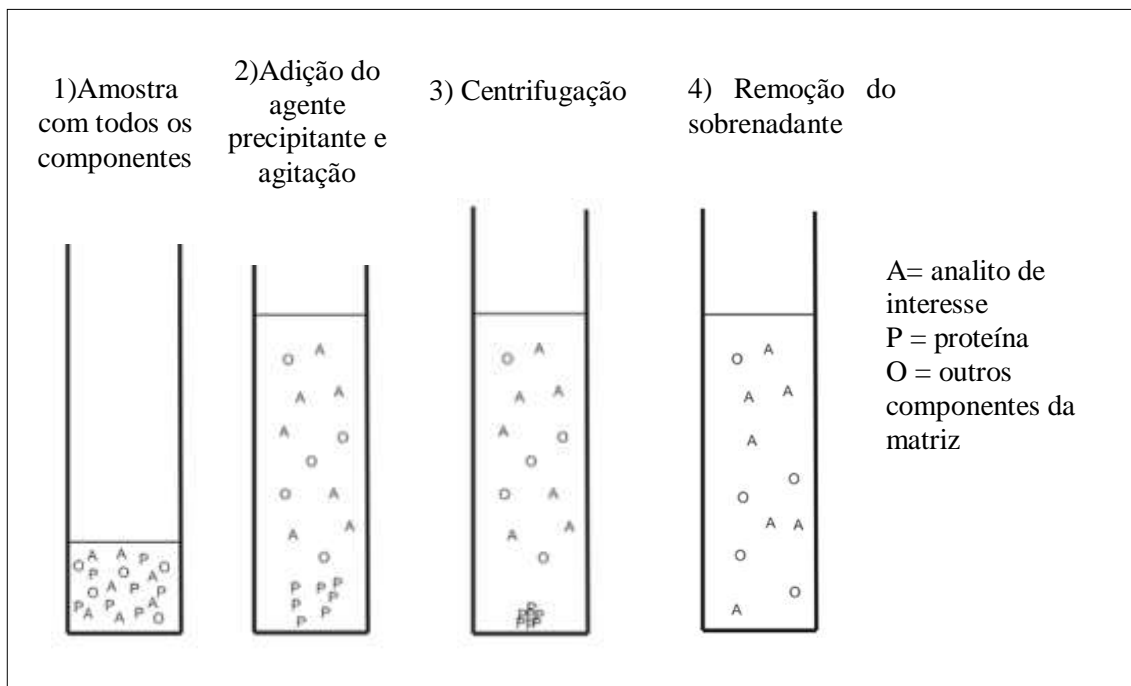
processos é possível eliminar o erro proveniente do analista. As técnicas miniaturizadas recentemente aprimoradas são de especial importância uma vez que, em alguns casos o volume de amostra é pequeno, como algumas amostras biológicas, impossibilitando o uso de grandes volumes. A diminuição do volume de solvente empregado nas técnicas de preparo de amostra também tem sua relevância em virtude da preocupação com o meio ambiente, visto que a maioria dos solventes orgânicos empregados são prejudiciais ao meio ambiente.

O plasma assim como outras matrizes biológicas apesar de, em sua maioria serem compostas por água, possui em sua composição diversos outros componentes como lipídeos diversos, sais minerais, açúcares, proteínas entre outros. A presença desses componentes nas soluções a serem injetadas nos sistemas cromatográficos pode prejudicar o resultado analítico ou mesmo comprometer o equipamento entupindo colunas e danificando os tanto a parte fluídica quanto os sistemas de detecção.

#### **1.4.1. Precipitação protéica**

A precipitação proteica é uma técnica de preparo de amostra bastante utilizada visto que é uma técnica simples, rápida, de fácil manipulação e de baixo custo [39]. Essa técnica se baseia na desnaturação das proteínas pelos agentes precipitantes que alteram suas estruturas secundárias e terciárias devido à quebra de interação intramoleculares fazendo com que a proteína exponha grupos hidrofóbicos e conseqüentemente se enovele e precipite [39-43]. As etapas envolvidas na precipitação são: adição de solvente, agitação, centrifugação e remoção do sobrenadante (Figura 4).

Proteínas são biomoléculas formadas por uma sequência de aminoácidos, ligados por ligações peptídicas. As proteínas determinadas por três ou quatro estruturas: a estrutura primária é formada por ligações covalentes conhecidas por ligação peptídicas em que os aminoácidos são ligados uns aos outros pelo grupo amino e carboxílico formando a cadeia polipeptídica; a estrutura secundária é a conformação espacial formada por ligações estáveis em que ligações de hidrogênio ocorrem entre o grupo NH e C=O; a estrutura terciária é a estrutura tridimensional que a proteína adquire devido algumas ligações com enxofre (ponte dissulfeto) ou ligação com metais; a estrutura quaternária acontece quando a proteína possui mais de uma cadeia polipeptídica no qual os peptídeos possuem uma organização definida [44].



**Figura 4:** Esquema das diferentes etapas envolvidas nos preparo de amostras por precipitação proteica.

Diversos fatores podem promover a precipitação de proteínas, dentre eles a mudança de pH do meio em que a proteína se encontra, o aumento da temperatura, adição de solvente orgânico miscível com a amostra, presença de sal e de íons metálicos.

A mudança de pH do meio (e.g. adição de ácido tricloroacético, ácido perclórico ou ácido túngstico) atua na mudança de carga e da conformação da proteína, fazendo com que a repulsão eletrostática rompa as ligações de hidrogênio danificando as estruturas secundárias da proteína. Por um mecanismo semelhante o aumento da temperatura pode danificar as interações fracas da proteína, causando o rompimento de ligações de hidrogênio. Alguns solventes orgânicos miscíveis em água como acetonitrila, metanol, etanol e acetona também são empregados como agentes precipitantes. Esses solventes diminuem a constante dielétrica do meio causando o aumento das interações entre as proteínas devido ao deslocamento das moléculas de água da solução [39, 40, 44].

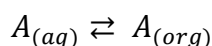
Já a adição de alguns sais pode reduzir a disponibilidade de água no meio provocando maior interação e aglomeração das proteínas e conseqüentemente a sua precipitação. Alguns íons metálicos (zinco, cobre, chumbo, mercúrio) possuem a capacidade de complexar com algumas proteínas formando sais insolúveis [40, 44].

A precipitação proteica já foi utilizada na determinação de diversos fármacos em plasma como ibersatana [45], epinefrina e norepinefrina[46] staglipitina [47], cobimetinibe [48], triptorrelina [49], granisetrona [50].

Algumas vezes a precipitação proteica antecede ou sucede uma segunda técnica de preparo de amostras aumentando assim a capacidade de eliminação de interferentes do método. Em um trabalho de Li e colaboradores publicado em 2012 a técnica de precipitação de proteínas foi empregada em um dispositivo de multiposços previamente à extração em fase sólida na extração de cefnidir em plasma de cachorro da raça Beagle. A finalidade desse método foi a sua aplicação para estudos farmacocinéticos *in vivo* do cefdinir encapsulado [51].

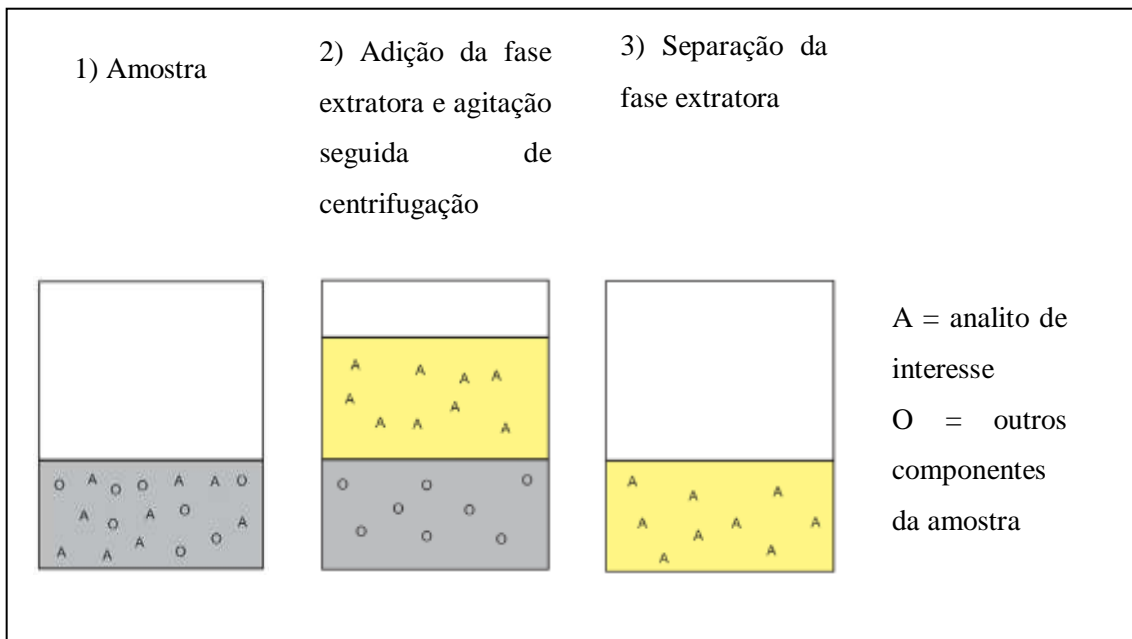
#### 1.4.2. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (ELL) é uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizadas para análise de fármacos em fluídos biológicos [40]. Essa técnica se baseia na partição de um analito (A) entre duas fases imiscíveis.



Nessa técnica, em geral, uma das fases possui caráter aquoso (amostra de fluído biológico) e a outra fase caráter orgânico e imiscível (solvente orgânico). Os compostos que estão na fase aquosa quando em contato com a fase orgânica irão se distribuir, entre as fases, segundo seus coeficientes de partição e, após a agitação, migrar para a fase extratora (Figura 5). Para que ocorra a extração é importante que a fase orgânica seja imiscível na amostra e ainda solubilize bem os analitos de interesse, tornando assim a fase orgânica um melhor acceptor [39, 40].

A extração ocorre quando os dois líquidos são postos em contato em um recipiente seguido de agitação para acelerar o processo de transferência de massas. Devido à possível formação de emulsão, pode-se empregar, após a agitação, a centrifugação, adição de sal ou ainda o resfriamento para auxiliar a separação de fases.



**Figura 5:** Esquema das diferentes etapas envolvidas em uma extração líquido-líquido.

É possível associar a partição do composto entre as duas fases imiscíveis com a constante de distribuição de Nerst  $K_d$  (Equação 01), onde são correlacionadas a concentração do composto particionado na fase orgânica ( $C_{org}$ ) e sua concentração na fase aquosa ( $C_{aq}$ ) em equilíbrio termodinâmico.

$$K_d = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \quad \text{Equação 01}$$

Já a fração extraída da quantidade total de matéria presente na amostra também chamada de eficiência ( $E$ ) dependerá dos volumes e concentrações das respectivas fases (volume das fases orgânica ( $V_{org}$ ) e aquosa ( $V_{aq}$ )) como descrito na Equação 02.

$$E = \frac{C_{org} \cdot V_{org}}{C_{org} \cdot V_{org} + C_{aq} \cdot V_{aq}} \quad \text{Equação 02}$$

Rearranjando a Equação 01 e 02 podemos observar que a fração extraída depende da relação dos volumes das fases imiscíveis e da constante de distribuição (Equação 03).

$$E = \frac{K_d \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}}}{1 + K_d \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}}} \quad \text{Equação 03}$$

Para obter eficiência de extração apreciável de composto com baixa constante de distribuição é aconselhável empregar volumes de solvente extrator mais elevados o que

torna o procedimento inviável além de ambientalmente pouco amigável. Outra estratégia nesse caso é realizar mais de uma extração (extração sequencial) para uma mesma amostra a fim de aumentar a fração extraída. Empregando a Equação 04 é possível prever a porcentagem de extração obtida (E) com “n” extrações sequenciais ou ainda calcular o número de extrações sequenciais (n) necessárias para se obter uma fração extraída desejada:

$$E = 1 - \left[ \frac{1}{1 + K_d \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}}} \right]^n \quad \text{Equação 04}$$

Em que n é o número de extrações realizadas [39, 40].

Outro fator importante e que deve ser observado na extração líquido-líquido é o pH da fase aquosa especialmente quando pretende-se extrair eletrólitos fracos. Frequentemente analitos na forma não ionizada apresentam maior solubilidade na fase orgânica. Quando o composto apresenta caráter básico, haverá uma maior eficiência de extração quando a fase aquosa estiver em pH preferencialmente duas unidades acima do  $pK_a$  do analito mais básico. Por outro lado quando o composto possuir caráter ácido, a extração será maior quando a fase aquosa apresentar pH duas unidades abaixo do  $pK_a$ .

Para extrair compostos ionizáveis altamente hidrofílicos pode se utiliza agentes complexantes ou formadores de par iônico como estratégia para aumentar a fração de extração [52]. O agente de par iônico, representado por um contra-íon com uma porção lipossolúvel se associa ao analito de interesse neutralizando a carga do analito e elevando a sua afinidade pela fase orgânica.

A adição de sal à amostra (*salting out*) também é uma estratégia amplamente empregada em ELL para auxiliar no aumento da constante de distribuição [53, 54]. Quando se adiciona sal na fase aquosa, as moléculas de água, em geral, apresentam uma tendência maior em solvatar os cátions e ânions do sal do que do próprio analito, o que reduz sua solubilidade na amostra e aumenta assim sua afinidade e distribuição para a fase orgânica [39, 55].

A extração líquido-líquido já foi utilizada para extração de diversos compostos em diversas matrizes como, por exemplo, na extração de clindamicina [56], bixina,

norbixina[57] e odanacatib [58] em plasma. Um sistema de 96 reservatórios foi utilizado para extração de suvorexanto de plasma humano[59].

Recentemente houve um grande avanço em relação às técnicas de preparo de amostras em especial em relação à miniaturização de técnicas clássicas como a extração líquido-líquido.

Em 1995 foi desenvolvido o precursor da microextração em gota única (SDME)[60] em que uma gota suspensa foi utilizada mantida em contato com uma fase gasosa para análise de gás atmosférico. No ano seguinte foi publicado o primeiro trabalho demonstrando o potencial da SDME. Neste trabalho uma gota de octano foi suspensa por uma agulha em uma solução aquosa sobre agitação para manter a transferência de analito da fase aquosa para a fase orgânica [61]. Essa é uma técnica com alta capacidade de concentração visto que o volume final da amostra é de apenas alguns microlitros (1-3  $\mu\text{L}$ ) [62]. Diversos são os fatores que influenciam a SDME entre eles: a constante de distribuição do analito entre as fases; tipo de seringa utilizado; volume da gota; volume de amostra; velocidade de agitação; tempo de extração; temperatura, entre outros [63]. A variação do volume da gota pode afetar a precisão do método desenvolvido e a estabilidade da gota, sendo a instabilidade da gota devido à agitação da amostra a principal desvantagem desta técnica. A SDME já foi utilizada na extração de alcaloides [64] e anti-histamínicos [65] em urina e outros fármacos em plasma [66, 67].

Outra técnica de extração líquido-líquido desenvolvida nos últimos anos foi a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Em 2006, a técnica foi desenvolvida baseada na dispersibilidade de solvente empregando um sistema ternário de solventes [68]. A técnica consiste na injeção rápida de uma mistura de um solvente dispersor juntamente com um solvente extrator dentro da amostra contendo os analitos. O solvente dispersor deve ser solúvel na fase aquosa e fase orgânica. Após a injeção rápida a mistura solvente dispersor-solvente extrator se dispersa em diminutas gotículas na fase aquosa, promovendo assim maior área de contato do solvente extrator com os analitos. A etapa de centrifugação é necessária para separação da fase aquosa com o solvente dispersor da fase orgânica. A impossibilidade de automação devido à etapa de centrifugação é a principal desvantagem da DLLME. Aos principais fatores que influenciam esta técnica são os tipos de solventes utilizados e o volume do solvente

extrator e dispersor[40] sendo esta técnica rápida, de baixo custo e de alto poder de enriquecimento[69]. A DLLME foi utilizada para análise de drogas de abuso em plasma [70], na determinação de antipirina em saliva [71] além da determinação de alcaloide em plasma humano[72].

A microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) é uma alternativa a microextração em gota única. A HF-LPME é uma técnica que foi desenvolvida em 1999 em que se utiliza uma membrana porosa embebida em um solvente que separa a fase doadora (amostra) da fase receptora. A fase receptora fica retida dentro da fibra e mantém contato com a fase aquosa por meio de uma fina camada líquida suportada dentro dos poros da fibra. A vantagem da fibra oca sobre a SDME é que a extração em fibra oca não corre o risco da dispersão da gota devido agitação da fase aquosa e também a possibilidade de haver material particulado na amostra [73, 74], entretanto devido ao pequeno volume de fase extratora utilizada, a precisão pode ser prejudicada. Essa técnica já foi utilizada para determinação de muscimol em urina humana [75] e para análise de aminas aromáticas policíclicas em sangue humano [76].

### **1.4.3. Extração em fase sólida**

A extração em fase sólida (SPE) é a segunda técnica de preparo de amostra mais difundida para a extração e purificação de fármacos em fluídos biológicos [40]. As principais finalidades dessa técnica são a remoção de interferentes, pré concentração dos analitos, dessalinização de amostras, derivatização *in situ*, estocagem e transporte de amostras além da mudança de fase. Essa técnica possui diversas vantagens, dentre elas: alta capacidade de recuperação, altas taxas de pré-concentração devido ao fato do volume final poder ser menor que o volume inicial da amostra, facilidade de recolher a fração desejada, capacidade de eliminar materiais particulados uma vez que o sorvente age como um filtro, menor consumo de solvente orgânico quando comparado a ELL, facilidade de manusear os cartuchos, disponibilidade de aparelhos automatizados e a não formação de emulsões [40, 77].

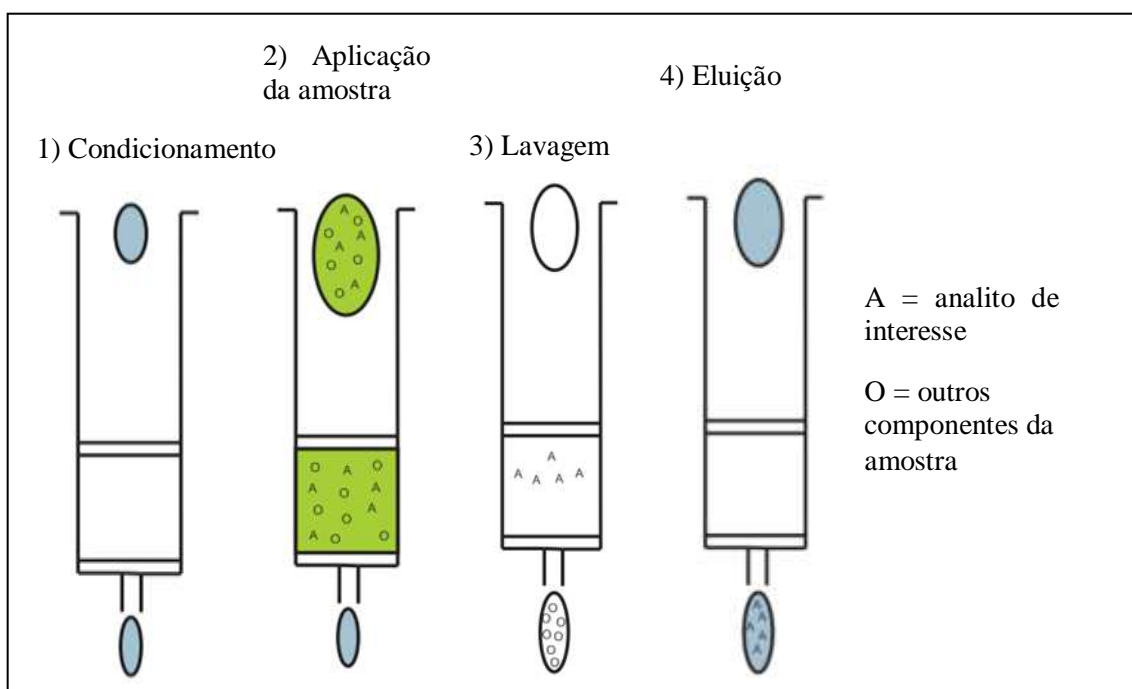
Os princípios e mecanismos envolvidos na SPE podem ser classificados como: partição, adsorção, troca iônica e exclusão. Neste caso, a fase estacionária muitas vezes é um líquido suportado quimicamente em um sólido, representado geralmente pela sílica gel ou sílica quimicamente modificada. O analito ao passar pela extração se distribui entre a fase móvel líquida e a fase estacionária. Quando a fase estacionária é

um líquido trata-se da partição já a adsorção ocorre quando a fase estacionária é um sólido. A troca iônica por outro lado se baseia na retenção por interação eletrostática. O material sorvente possui um grupo ionizável ou iônico, carregado positivamente ou negativamente. Para ocorrer a retenção o sorvente possui uma carga oposta a carga do composto de interesse, ocorrendo assim a retenção do analito. O princípio da exclusão se fundamenta na separação por tamanho de partícula. O sorvente é formado por um material com poros que retém compostos de tamanhos menores devida a maior facilidade de penetração desses compostos. Os compostos maiores, por outro lado, possuem maior dificuldade de penetração nos poros e por isso passam com maior facilidade pelo sorvente. Outros sorventes também são utilizados na extração em fase sólida como: sorventes magnéticos, polímeros de impressão molecular, nanotubos de carbono[40, 77, 78].

A técnica de SPE é realizada mais amplamente empregando cartuchos do tipo seringa (Figura 6) em que o material sorvente é contido entre dois filtros de porosidade de 20  $\mu\text{m}$ . O volume dos cartuchos mais comuns varia de 0,5 a 10 mL, com uma massa que pode variar de 35 mg a 2 g.

Basicamente a SPE é realizada em quatro etapas principais. A primeira é a etapa de condicionamento do sorvente. Nessa fase, o material sorvente é preparado para receber a amostra. Na segunda etapa a amostra é aplicada na fase estacionária para que os compostos de interesse sejam sorvidos. A terceira etapa é a remoção de interferentes (limpeza ou lavagem) onde se busca a eliminação seletiva dos interferentes que não são interessantes para a análise. A última etapa é a etapa de eluição em que o analito é eluído em um volume adequado de solvente a fim de ter uma pré-concentração.

O material sorvente mais empregado na SPE ainda são aqueles baseados em sílica e sílica modificada com grupos C18, porém existem outros para aplicações mais específicas. A escolha depende das características do analito e também dos interferentes presentes na matriz. Na tabela 1 podemos verificar os diversos tipos de sorventes e os respectivos mecanismos sortivos.



**Figura 6:** Esquema da extração em fase sólida. 1) etapa de condicionamento em que um solvente é percolado pelo cartucho. 2) etapa de aplicação da amostra. 3) etapa de lavagem ou limpeza em que os interferentes são eliminados do sorvente. 4) etapa de eluição em que os analitos de interesse são removidos do cartucho.

**Tabela 1:** Sorvente utilizados em extração em fase sólida.

Fase normal (adsorção)	Sílica (SiOH) Alumina (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) Florisil (Mg <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> )
Fase normal (fase quimicamente ligada à sílica)	Ciano (CN) Amino (NH <sub>2</sub> ) Diol (-CH(OH)-CH(OH)-)
Fase reversa (absorção, alta hidrofobicidade)	Octadecil (C18) Octil (C8)
Fase reversa (hidrofobicidade intermediária)	Phenyl Ciclohexil Diphenyl
Fase reversa (baixa hidrofobicidade)	Butil (C4) Etil (C2) Metil (C1)
Troca iônica	Amina secundária ligada à sílica Amina quaternária ligada à sílica Ácido sulfônico ligado à sílica Ácido carboxílico ligado à sílica

Uma das variantes dos dispositivos de SPE são as placas com 96 reservatórios ou poços. Cada reservatório funciona como um cartucho de extração em fase sólida onde o sorvente encontra-se imobilizado entre dois filtros. Os sistemas 96 poços são especialmente interessantes quando uma frequência analítica maior é requerida. A SPE possui também uma ampla gama de sistemas automatizados nos quais as etapas de extração, limpeza (*clean up*), eluição e análise cromatográfica são realizados automaticamente pelo equipamento. Apesar do custo inicial elevado, esses sistemas apresentam vantagens como redução do tempo de análise e diminuição dos erros provenientes de manipulação [40, 77].

Devido suas vantagens a SPE já foi utilizada em diversos trabalhos como na extração de fluoroquinolonas em ovos com aplicação de campo elétrico [79]. Rossmann e colaboradores desenvolveram em 2014 um método para análise de muitos antibióticos em águas residuais [80]. Diversos trabalhos foram descritos empregando a SPE para extração de medicamentos em fluídos biológico como a doxiciclina em gordura de galinha [81], a etoricoxibe em plasma humano empregando um sistema de SPE online [82], o alendronato por SPE magnética [83] e drogas ilícitas por microSPE em plasma e urina humana [84].

Com o avanço do desenvolvimento das técnicas de preparo de amostra, outras variações da técnica de SPE foram surgindo ao longo dos anos.

Uma das variações foi a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) que é uma modificação mais recente da extração em fase sólida. A dispersão da matriz em fase sólida consiste na homogeneização mecânica da amostra com um suporte sólido que pode ser um sorvente de SPE. Durante a homogeneização, os analitos serão adsorvidos no suporte para posterior eluição. Após a mistura, o conjunto formado é colocado em um tubo semelhante aos utilizados na extração em fase sólida convencional. O material contendo a amostra e a matriz ficam acondicionados entre dois filtros e em seguida é realizada a eluição seletiva dos analitos com um solvente adequado. Diversos fatores devem ser levados em conta na dispersão da matriz em fase sólida como: suporte sólido dispersante; proporção amostra/suporte; tempo de mistura; solvente de eluição [85]. A MSPD já foi utilizada para análise de resíduos de pesticidas em alimentos e amostras ambientais [86] além de antitireoidianos em amostras de leite e urina [87].

Outra técnica bastante empregada na extração e purificação de analitos em fluídos biológicos é a microextração em fase sólida (SPME). A SPME é uma técnica miniaturizada em que a extração ocorre em uma fibra fina (espessura 0,11-0,16 mm) de cerca de 1 cm recoberta por filme polimérico extrator (espessura 0,1 mm)[40]. Devido ao tamanho da fibra, essa técnica permite que a injeção dos analito ocorra diretamente em um cromatógrafo gasoso após o aquecimento da fibra contendo os analitos sorvidos/absorvidos [88]. A extração acontece quando a fibra é exposta diretamente na amostra sobre agitação ou quando a fibra fica em contato com o vapor da amostra em um recipiente fechado. Neste último caso a extração é chamada de espaço confinado (*headspace*). Na extração por *headspace* os analitos devem ser voláteis para que eles sejam transferidos (evaporem) da amostra e entrem em contato com a fibra exposta. Dentre os fatores que influenciam a microextração em fase sólida podemos citar: o tipo de fibra, temperatura de extração, tempo de extração, pH, velocidade de agitação, força iônica e tempo de dessorção. Exemplos da aplicação da SPME em fluídos biológicos é a extração de clorexidina em saliva [89] e drogas recreativas em suor [90].

### **1.5. Técnicas de preparo de amostra empregadas para a determinação de bixina, metformina e compostos correlatos**

Dentre os diversos métodos de preparo de amostra mencionados, vários deles já foram empregados na determinação bixina, metformina e compostos correlatos em fluídos biológicos.

Levy e colaboradores descreveram em 1997 um método empregando a extração líquido-líquido para avaliar a extração de bixina em plasma humano. Neste trabalho foi utilizado um volume de amostra, 3 mL, com extrações múltiplas (3x). Como solvente extrator foi empregado uma mistura composta por etanol:clorofórmio (6:3, 9 mL). Com esta estratégia os pesquisadores conseguiram quantificar a bixina até a concentração de 2,8 ng bixina por mL de amostra de plasma devido a pré concentração obtida (3x). Contudo, neste trabalho não foram apresentados dados de validação para o método proposto [57].

A ELL também foi utilizada para avaliação de carotenoides como a luteína, licopeno e  $\beta$ -carotene em amostras plasma. Outra técnica baseada na ELL, a extração por solvente acelerado, também foi utilizada para determinação de carotenoides,

incluindo a bixina, em amostras de alimentos e elevados valores de recuperação foram obtidos [91].

Diversos métodos de extração foram relatados em métodos para determinação de metformina em fluídos biológicos sendo a precipitação proteica empregando acetonitrila a mais abundantemente utilizada [92-101]. Para esse mesmo fármaco também já foram reportados na literatura o uso de ácido tricloroacético [102] e ácido perclórico [103] como agentes precipitantes. Nestes trabalhos, os agentes precipitantes foram adicionados ao plasma seguido de agitação, centrifugação, separação do sobrenadante e finalmente injeção no sistema cromatográfico.

A extração em fase sólida também foi utilizada para a extração de metformina em amostras biológicas como plasma [104], água residual [105], suplementos dietéticos e ervas medicinais [106]. A grande dificuldade de extração da metformina nos métodos descritos é frequentemente associada à baixa afinidade desse medicamento pelos solventes orgânicos e sorventes apolares baseados em sílica de fase reversa o que pode ser comprovado pelas baixas recuperações observadas. Em alguns casos o problema da baixa recuperação da metformina por SPE não foi contornado mesmo utilizando sorventes híbridos [105]. A extração de fase sólida utilizando laurel sulfato de sódio como agente de par iônico foi reportado na análise de metformina e sitagliptina em plasma [107]. Um sorvente de troca catiônica foi empregado na extração de metformina em plasma [108]. A microextração em fase líquida empregando fibra oca também foi descrita para extração de metformina e rosiglitazona em amostras de plasma e urina [109].

Devido à falta de afinidade da metformina com grande parte dos solventes orgânicos mais comuns, a derivatização com cloreto de p-nitrobenzoiol foi empregada como recurso para auxiliar na extração líquido-líquido, uma vez que a metformina é um composto altamente polar [110].

## **1.6. Cromatografia líquida na determinação de fármacos em fluídos biológicos**

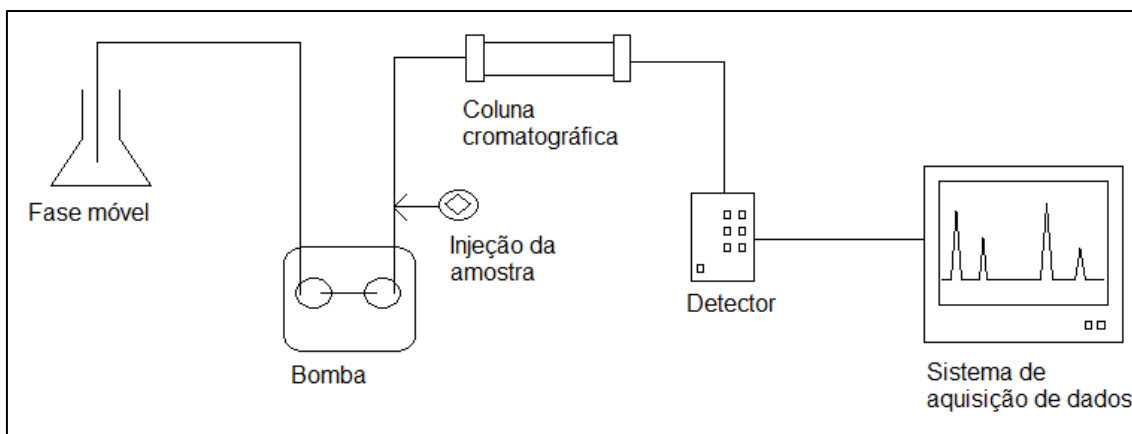
A cromatografia líquida de alto e ultra desempenho associada à diversos sistemas de detecção é uma técnica amplamente empregada para a determinação de fármacos em fluídos biológicos, devido a sua elevada capacidade de separar compostos

orgânicos, inorgânicos ou biológicos provenientes de diversas matrizes seja na indústria farmacêutica, de alimentos, petroquímica como em laboratórios forense e de análises clínicas.

A cromatografia é uma técnica de separação de compostos que se baseia nas diferentes interações dos analitos entre duas fases, sendo uma fase móvel e uma fase estacionária. Em 1906 o botânico russo Mikhail Tswett publicou, em uma revista de botânica, um trabalho em que ele percolou um extrato de planta por uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio. Após passar um solvente apolar pela coluna, Tswett percebeu que os diferentes pigmentos foram separados em bandas de cores diferentes [111]. Diferentemente de outros trabalhos que antecederam este Tswett propôs que essa separação ocorreu pelas diferenças de interação dos componentes com a fase móvel e a fase estacionária.

A cromatografia pode ser classificada por dois tipos a planar e em coluna. Na cromatografia planar a fase estacionária é suportada em um material plano ou um papel. A fase móvel é um líquido que se move por ação da capilaridade. Na cromatografia em coluna a fase estacionária se encontra empacotada dentro de um tubo. A fase móvel passa pela fase estacionária por meio da ação da gravidade (cromatografia líquida clássica), por capilaridade (cromatografia em camada delgada ou papel) ou por ação de uma pressão externa (cromatografia líquida, gasosa ou por fluido supercrítico). Podemos também classificar a cromatografia de acordo com a fase móvel em que se diferem de acordo com o fluido que carrega a amostra, podendo ser a fase móvel um líquido, um gás ou um fluido supercrítico [112].

Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) o sistema cromatográfico é constituído basicamente por um reservatório de fase móvel, o sistema de bomba de alta pressão, o injetor, uma coluna cromatográfica e um detector com sistema de aquisição de dados (Figura 7). A eluição pode ocorrer no modo isocrático em que a composição da fase móvel não altera ao longo da análise ou no modo gradiente em que a composição do solvente de eluição muda ao longo da corrida cromatográfica.



**Figura 7:** Sistema cromatográfico composto por fase móvel, bomba de alta pressão, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados.

A separação dos compostos de interesse ocorre na coluna que é recheada com a fase estacionária apropriada. A separação ocorre por diferentes mecanismos, sendo estes mecanismos basicamente os mesmos dos envolvidos na extração em fase sólida em que o tipo de interação com a fase estacionária é levado em conta. São eles: partição, adsorção, troca iônica, bioafinidade, quiral e exclusão[112]. Diversos são os tipos de fase estacionárias que se pode utilizar em cromatografia sendo as mais comuns as particuladas totalmente porosas, esféricas e de tamanho regular de até 3,5  $\mu\text{m}$ . Já materiais mais recentemente utilizados são aqueles baseados em monólitos de corpo contínuo, particulados totalmente porosos de diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$  ou ainda particulado superficialmente porosas e núcleo não poroso [113].

As colunas cromatográficas podem variar de tamanho de acordo com o interesse, podendo variar de 1-25 cm de comprimento nas colunas analíticas e acima de 20 cm as preparativas. O diâmetro interno também varia de acordo com a finalidade da separação, sendo as analíticas entre 1-4,6 mm e as preparativas maiores que 10 mm. Da mesma forma o tamanho de partícula da fase estacionária pode variar entre 1,5 a 10  $\mu\text{m}$  [112, 114].

Em cromatografia os sistemas de detecção estão conectados em série e após a coluna cromatográfica. Ao sair da coluna o analito entra no detector e gera um sinal que é visualizado na forma de um pico cromatográfico. O sinal é proporcional à concentração do analito na amostra. Os detectores podem ser universais, que geram um sinal para todos os componentes presentes na amostra ou seletivos, que geram sinais

somente para compostos que apresentem propriedades específicas. Dentre as características de um detector, é importante que ele seja: sensível, estável a diversos tipos de solvente, reprodutível, o sinal de ser proporcional a concentração em uma ampla faixa linear, não deve ser sensível à variação de temperatura nem de vazão, ser capaz de obter resposta rápida e ser de fácil manuseio. Muitos são os tipos de detectores empregados em cromatografia líquida, sendo os principais os de absorvância, fluorescência, eletroquímicos, índice de refração e espectrometria de massas [112, 115].

Com o advento da tecnologia foi possível o desenvolvimento de sistemas cromatográficos mais eficientes, que possibilitou a melhor separação e menor tempo de análise. Esse avanço foi possível devido a diminuição do tamanho de partícula, com colunas cromatográficas empacotadas com partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  e o diâmetro interno das colunas entre 1-2,1 mm. Devido à diminuição do tamanho das partículas foi necessário um sistema que suportasse maiores pressões (100 MPa). Foi necessária a diminuição dos volumes internos, redução da cela de detecção e maior velocidade de aquisição de dados. Esse sistema moderno foi denominado de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)[114, 116-118].

Por ser uma técnica extremamente relevante o UHPLC é bastante utilizado na análise de diversos tipos de compostos presentes em diversas matrizes [45-47, 76, 79, 80, 86, 119-122].

Como método de análise a cromatografia líquida é amplamente empregada como ferramenta para determinação de metformina e bixina em amostras biológicas. Podemos observar na Tabela 2 diversos métodos em que diversos tipos de colunas, fases móveis, técnicas de preparo de amostra foram utilizadas para análise de metformina e bixina.

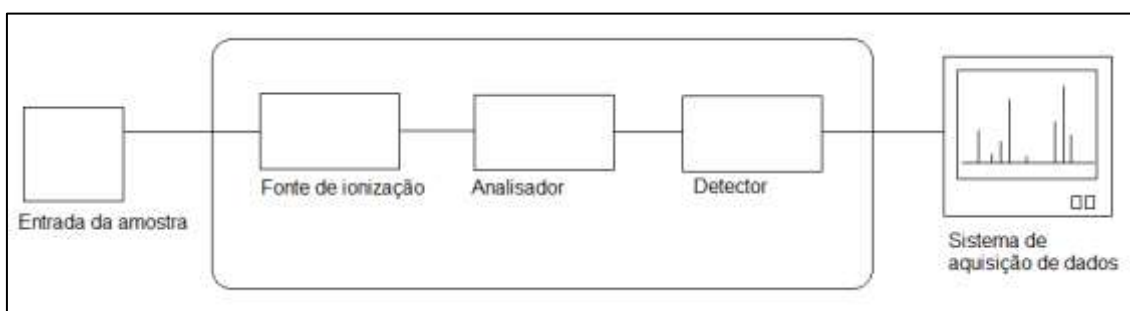
**Tabela 2:** Comparação das técnicas, colunas, fases móveis e preparo de amostra utilizadas na análise de metformina e bixina

<b>Autores/Ano</b>	<b>Técnica/Coluna</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Amostra</b>	<b>Preparo de amostra</b>
Attimarad <i>et al</i> , 2015 [97]	HPLC/C18	NH <sub>4</sub> Ac/MeOH	Plasma	PP
Polagani <i>et al</i> , 2013 [94], Chen <i>et al</i> , 2011 [100]	HPLC/C18	NH <sub>4</sub> Ac/ACN	Plasma	PP
Shah <i>et al</i> , 2016 [107]	HPLC/CN	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> /MeOH	Plasma	SPE
Koseki <i>et al</i> , 2005 [108]	HPLC/Troca iônica	NH <sub>4</sub> Ac/ACN	Plasma	SPE
Scherf-Clavel e Hogger, 2015 [123]	HPLC/HILIC	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> /ACN/C H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mancha de sangue seco	SPE modificada
Discenza <i>et al</i> , 2010 [92]	UHPLC/HILIC	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> /MeOH	Plasma	PP
Sherif <i>et al</i> , 2015 [99]	UHPLC/C18	ACN/CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Plasma	PP
Pontorolo <i>et al</i> , 2014 [95]	HPLC/HILIC	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> /ACN/C H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Plasma	PP
Porta <i>et al</i> , 2008 [93]	HPLC/Fenil	Tampão fosfato/ACN	Plasma	PP
Chhetri <i>et al</i> , 2014 [103]	HPLC/C18	ACN/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / lauril sulfato de sódio	Plasma	PP
Yardimci <i>et al</i> , 2007 [98]	HPLC/Fenil	Tampão acetato /ácido acético/ACN	Plasma	PP
Bem-Hander <i>et al</i> , 2015 [109]	HPLC/C18	Tampão fosfato/ACN	Plasma e urina	HF-LPME
Porwal e Talele, 2016 [102]	HPLC/Fenil	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /ACN	Plasma	PP
Levy <i>et al</i> , 1997 [57]	HPLC/C18	ácido acético/ACN	Plasma	ELL

## 1.7. Espectrometria de massas na determinação de fármacos em fluidos biológicos

O espectrômetro de massas é um instrumento extremamente versátil e poderoso na identificação e quantificação de diversos composto orgânicos e inorgânicos especialmente quando associado à cromatografia líquida de alta e ultra eficiência. Suas aplicações abrangem todas as áreas da química analítica e os mais diversos ramos do conhecimento. O princípio fundamental da espectrometria de massas se baseia na determinação de diferentes espécies químicas ionizadas em função das suas respectivas relações massa carga ( $m/z$ ) [115, 124].

O espectrômetro de massas é na verdade um equipamento complexo formado por componentes com funções distintas. O primeiro componente na sequência por onde passam os analitos é o chamado sistema de entrada ou infusão da amostra, responsável pela injeção no espectrômetro a uma vazão controlada. Esse sistema pode ser representado por uma bomba de seringa ou um cromatógrafo (a líquido ou a gás). Na entrada do espectrômetro a amostra passa por uma fonte de ionização onde os analitos são ionizados e íons livres, em fase gasosa, adentram ao espectrômetro. O modulo seguinte é o analisador de íons que irá separar os íons que adentraram de acordo com suas relações massa/carga. Os íons separados pelo analisador colidem então com um detector de íons que faz a contagem desses íons gerando um sinal elétrico que é convertido em um espectro de massas e/ou em um cromatograma de íons dependendo do caso (Figura 8).



**Figura 8:** Sistema do espectrômetro de massas composto por entrada da amostra, fonte de ionização, analisador, detector e sistema de aquisição de dados.

As fontes de ionização são muito importantes no processo uma vez que para que os diferentes analitos sejam diferenciados eles precisam ser estar ionizados para que

campos eletromagnéticos atuam sobre eles. Existem diversos métodos de ionização dentre eles pode-se destacar o impacto de elétrons (EI), a ionização química (CI), ionização por eletronebulização (ESI), o bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), dessorção por eletronebulização (DESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização a pressão atmosférica (APPI) [115, 124]. Quando a cromatografia gasosa é acomplada a espectrometria de massas as principais fontes de ionização utilizadas são a EI e a CI, pois essas fontes encontram-se sob alto vácuo, já para cromatografia líquida as fontes mais utilizadas são ESI, APCI e APPI.

Os analisadores são os responsáveis pela seleção dos íons de acordo com a  $m/z$  de interesse do analista. Os analisadores mais comuns são o quadrupolo (Q), a armadilha de íons de Paul (*ion-trap*), armadilha de íons de Kindon (*orbitrap*) e tempo de voo (TOF). O analisador pode ser de alta ou baixa resolução. A resolução do analisador está associada à capacidade do espectrômetro diferenciar compostos com massa nominal iguais [115].

Alguns métodos de ionização são capazes não só de ionizar as moléculas de interesse, mas também são capazes de fragmentar os íons, gerando fragmentos carregados eletricamente característicos de íons filhos. Essa fragmentação é importante porque ajuda na elucidação da estrutura química dos compostos. Quando a fonte de ionização não é energética o suficiente para formar íons é possível utilizar a espectrometria sequencial em que dois analisadores são colocados em sequência. No primeiro analisador ocorre a seleção do íon do analito de interesse. Em seguida o íon selecionado entra em uma cela de colisão onde o íon sofre uma fragmentação induzida por um gás inerte gerando fragmentos específicos que são transferidos para o segundo analisador onde ocorre a seleção dos fragmentos gerados na colisão [124].

Diversos métodos empregando a fonte de ionização ESI associada com analisadores do tipo quadrupolo ou triplo quadrupolo já foram utilizados na determinação de metformina em plasma de rato [92], plasma humano [95, 97, 99, 101, 107, 108], sangue seco [123]. O ESI associado com analisadores sequenciais do tipo quadrupolo-armadilha de íons (Qtrap) também já foi empregado em estudos envolvendo metformina em plasma humano [100]. Uma fonte de dessorção por laser com fonte de ionização APCI com analisador do tipo triplo quadrupolo foi utilizado para

determinação de metformina em sangue seco de humanos e ratos [125] e em plasma de rato[126].

## **2. Objetivo Geral**

Avaliar diferentes técnicas de preparo de amostras visando desenvolver e validar um método para determinação de metformina e bixina em plasma de rato empregando a cromatografia de ultra eficiência associado a detector por absorbância com arranjo de fotodiodos e espectrometria de massas sequencial.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar diferentes colunas cromatográficas buscando a melhor retenção, tempo de análise e seletividade para os compostos alvos;
2. Avaliar os parâmetros da técnica de precipitação de proteínas para obter melhor extração de metformina do plasma;
3. Avaliar os parâmetros de extração em fase sólida para obter a melhor extração de bixina do plasma;
4. Avaliar os parâmetros de extração líquido-líquido para obter a melhor extração de bixina do plasma;
5. Validar o método da precipitação protéica e da extração líquido-líquido desenvolvido;
6. Empregar o método validado em amostras de ratos tratados com sistemas de liberação controlada contendo bixina e metformina.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Reagentes e soluções**

Os padrões analíticos dos fármacos utilizados no trabalho foram bixina (96,6%, ChromaDex) e metformina (99,8%, Sigma-Alcrich). A água empregada para o preparo das soluções e fase móvel foi do Tipo I (água deionizada) obtida de um sistema de deionização Milli-Q (Milipore). Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), foram ambos grau HPLC (J.T.Baker); éter dietílico (Vetec; Neon); ácido tricloroacético (ATCA, Synth); acetona (Sigma-Aldrich); acetato de amônio (NH<sub>4</sub>Ac, Merck), cloreto de sódio (NaCl, Synth); ácido fórmico (Merck) grau analítico ou superior. Os sorventes para extração em fase sólida avaliados foram à base de sílica com fase quimicamente ligada com grupos octadecil (C18) Strata C18T (55 µm, 140A, Phenomenex); com grupos octil (C8) Strata C8 (55 µm, 140A, Phenomenex) e HFC8 (Agilent); com grupo fenil –Strata Phenyl (50 µm, 65A, Phenomenex) e fases poliméricas StrataX (33 µm, Phenomenex) e Oasis HLB (30 µm, 80A, Waters).

#### **3.2. Equipamentos**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra desempenho UPLC® Aquity H-Class (Waters). O sistema de detecção foi efetuado por um detector por absorvância com arranjo de fotodiodo (PDA, Waters) e um espectrômetro de massas Xevo TQD (Waters) do tipo triplo quadrupolo com ionização por eletronebulização.

Para a agitação das amostras foi utilizado um agitador tipo Vortex Classic (Velp) e para centrifugação foi utilizado uma centrífuga de tudo de polipropileno 5415D (Eppendorf). Para dissolução de amostras e degaseificação da fase móvel foi empregado um aparelho de ultrassonicação (Ney Ultrasonic).

#### **3.3. Amostras**

As amostras de plasma de ratos sem a presença de bixina e metformina foram obtidas do Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG), estocados a -20 °C e ao abrigo da luz por no máximo 3 meses. Os

estudos desenvolvidos nesse trabalho receberam aprovação pelo comitê de ética responsável que se encontra no Anexo I.

### **3.4. Parâmetros cromatográficos**

A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna Acquity UHPLC® HSS C18 (100 x 2,1mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ) com uma coluna de guarda de 0,5 cm de mesma fase estacionária e um filtro de linha de 0,2  $\mu\text{m}$ . A eluição foi realizada com (A)  $\text{NH}_4\text{Ac}$  20  $\text{mmol L}^{-1}$  em água deionizada e (B) 0,5% ácido fórmico em ACN no modo gradiente. O gradiente utilizado foi: 0-1min, 99% (A); 1,00-1,01 min, 99-10% (A); 1,01-3,50 min, 10-0% (A); 3,50-5,00 min, 0% (A); 5,00-5,01 min, 0-99% (A); 5,01-7,00 min, 99% (A). A vazão da fase móvel foi mantido em 0,300  $\text{mL min}^{-1}$  e tanto a temperatura da coluna como do amostrador foram mantidos a 30 °C. O volume de injeção foi de 10,0  $\mu\text{L}$ .

### **3.5. Parâmetros da espectrometria de massa**

A fonte de ionização empregada foi a de eletronebulização no modo positivo. A temperatura de dessolvatação foi de 450 °C com uma vazão de 650  $\text{L min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ . A temperatura de bloco foi mantida em 150 °C, a vazão de  $\text{N}_2$  do cone de 10  $\text{L min}^{-1}$  e a voltagem do capilar de 2,5 kV. O modo de aquisição dos dados foi o de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A análise dos dados foi realizada utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters).

### **3.6. Avaliação das colunas cromatográficas**

Nesta avaliação foram empregadas cinco diferentes colunas de fase reversa e com exceção da coluna com grupos fenil (Agilent) todas as outras colunas foram da marca Waters. Algumas características das colunas são descritas na Tabela 3.

Para esta avaliação foram utilizadas solução padrão de metformina na concentração 500  $\text{ng mL}^{-1}$  preparada em água e solução padrão de bixina na concentração de 1000  $\text{ng mL}^{-1}$  preparada em metanol.

**Tabela 3:** Especificações das colunas cromatográficas avaliadas.

Colunas	Dimensões (mm)	Tamanho de partícula( $\mu\text{m}$ )	Densidade de ligante ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	% carbono	Área superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
Poroshell 120 Phenyl Hexyl	3,0x 50	2,7			
Acquity UPLC® BEH C18	2,1x 50	1,7	3,1	18	185
Acquity UPLC® HSS T3	2,1x 50	1,8	1,6	11	230
Acquity UPLC® HSS C18	2,1 x 100	1,8	3,2	15	230
Acquity UPLC® HSS C18 SB	2,1x 50	1,7	1,6	8	230

### 3.7. Avaliação dos parâmetros de precipitação proteica para extração de metformina de amostras de plasma

#### 3.7.1. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina de amostras de plasma

Foram avaliados três tipos diferentes de agentes precipitantes e suas combinações para a extração da metformina das amostras de plasma. Os três agentes precipitantes avaliados foram: solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético preparado em água deionizada, acetonitrila e acetona.

As amostras foram preparadas em tubos de polipropileno de 2 mL fortificando 200  $\mu\text{L}$  de plasma com 10  $\mu\text{L}$  de solução de metformina (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Às amostras de plasma fortificadas foram adicionados os agentes precipitantes em suas devidas proporções como apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Proporções dos agentes precipitantes avaliados na extração de metformina em amostras de plasma.

Experimento	Solução de precipitação avaliada
1	100 $\mu\text{L}$ de ATCA 10% (m/v) + 200 $\mu\text{L}$ de água deionizada
2	500 $\mu\text{L}$ de acetona
3	500 $\mu\text{L}$ de ACN
4	100 $\mu\text{L}$ de ATCA 10% (m/v) + 500 $\mu\text{L}$ de acetona
5	250 $\mu\text{L}$ de ACN + 250 $\mu\text{L}$ de acetona
6	100 $\mu\text{L}$ de ATCA 10% (m/v) + 500 $\mu\text{L}$ de ACN
7	100 $\mu\text{L}$ de ATCA 10% (m/v) + 250 $\mu\text{L}$ de acetona + 250 $\mu\text{L}$ de ACN

ATCA = ácido tricloroacético, ACN = acetonitrila.

Em seguida as amostras de plasma adicionadas dos agentes precipitantes foram agitadas por 30 segundos em vortex e levadas para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Duzentos microlitros (200 µL) do sobrenadante foram recolhidos em vials, diluídos com 400 µL de água deionizada e 5 µL injetados no cromatógrafo. As condições utilizadas nos testes acima foram obtidas a partir de testes prévios.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de precipitação e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a precipitação. A recuperação de extração foi calculada empregando a Equação 5:

$$\text{Porcentagem de extração} = \frac{\text{área do extrato fortificado antes da extração}}{\text{área do extrato fortificado após a extração}} \times 100 \quad \text{Equação 05}$$

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações (n = 2) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.7.2. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina de amostras de plasma**

Para a avaliação da concentração do agente precipitante (ATCA em água deionizada) foram utilizadas soluções nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/v).

As amostras foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 200 µL de plasma com 10 µL de solução de metformina (10 µg mL<sup>-1</sup>) e 12 µL de bixina (48,5 µg mL<sup>-1</sup>). Às amostras fortificadas foram adicionados 200 µL de ATCA em diferentes concentrações (5, 10 e 15%, m/v).

Em seguida as amostras de plasma adicionadas dos agentes precipitantes foram agitadas por 30 segundos em vortex e levadas para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Cem microlitros (100 µL) do sobrenadante foram recolhidos em vials, diluídos com 500 µL de água deionizada e 5 µL injetados no cromatógrafo. Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de precipitação e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a precipitação.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.8. Otimização da extração líquido-líquido para extração de bixina de amostras de plasma**

#### **3.8.1. Avaliação do tipo de solvente extrator na extração de bixina de amostras de plasma**

Foram avaliados quatro tipos diferentes de solventes extratores éter dietílico, diclorometano e hexano e a mistura de acetonitrila/éterdietílico (2/5:v/v).

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Às amostras fortificadas foi adicionado 1 mL do solvente orgânico extrator, em seguida agitadas por 30 segundos em vortex e levadas para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm.

Após a centrifugação, 800  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foram recolhidos e levados para completa evaporação do solvente em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) seguida da redissolução do resíduo com 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.8.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra de plasma na extração de bixina**

Neste estudo as amostras de plasma fortificadas com bixina foram previamente diluídas com água deionizada em diferentes proporções (plasma/água - 400/100  $\mu\text{L}$  e 400/200 $\mu\text{L}$ ) para avaliar seu efeito na porcentagem de extração.

As amostras de plasma foram preparadas em tubos de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Essas amostras fortificadas foram divididas em dois grupos. Em um grupo foi avaliado a adição de 100 e no outro 200  $\mu\text{L}$  de água ao plasma fortificado para verificar o efeito da diluição.

Às amostras fortificadas foi adicionado 1 mL de éter dietílico, em seguida agitadas por 30 segundos em vortex e levadas para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm.

Após a centrifugação, 800  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foram recolhidos e levados para completa evaporação do solvente em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) seguida da redissolução do resíduo com 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila.

Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.8.3. Avaliação do tempo de agitação entre a amostra de plasma e o solvente extrator na extração de bixina**

Neste estudo foram avaliados diferentes tempos de agitação entre a solução de extração e a amostra de plasma.

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Às amostras fortificadas foi adicionado 1 mL do solvente orgânico extrator (éter dietílico) e separadas em dois grupos. Um grupo foi agitado por 30 segundos enquanto que o outro foi agitado por 60 segundos, ambos em vortex. Em seguida ambos os grupos foram levados para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação, 800  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foram recolhidos e levados para completa evaporação do solvente em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) seguida da redissolução do resíduo com 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

#### **3.8.4. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma na extração de bixina**

Neste estudo foi avaliado o efeito da adição de sal (*salting out*) na porcentagem de extração de bixina em amostras de plasma.

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As amostras fortificadas foram separadas em dois grupos. Um deles recebeu a adição de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetato de amônio (20%, m/v), 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de cloreto de sódio (20%, m/v), 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidrogenofosfato dissódico (10%, m/v) enquanto que o outro grupo não recebeu a adição dessa solução.

Aos dois grupos de amostras fortificadas foi adicionado 1 mL de éter dietílico, em seguida agitadas por 30 segundos em vortex e levadas para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação, 800  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foram recolhidos

e levados para completa evaporação do solvente em banho Maria ( $\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) seguida da redissolução do resíduo com 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.8.5. Avaliação da extração líquido-líquido sequencial na extração de bixina das amostras de plasma**

Para esta avaliação foi utilizado o éter dietílico como solvente extrator e comparado os valores de recuperação empregando duas e três extrações sequenciais.

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

As extrações empregando éter dietílico foram realizadas empregando duas e três extrações com 1,2 mL de éter dietílico.

No modo de duas extrações sequenciais foi adicionado às amostras uma primeira alíquota de 1,2 mL de éter dietílico. A mistura foi então agitada por 30 segundos em vortex e levada para centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação 1000  $\mu\text{L}$  da fase orgânica (denominado extrato 1) foram recolhidos e armazenados. À fase aquosa residual foram adicionados mais 1,2 mL de éter dietílico. Em seguida o tubo foi mais uma vez agitado por 30 segundo em vortex e levado para centrifugação por 10 min a 13000 rpm. Uma segunda alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foi recolhida (denominada extrato 2) e adicionada ao primeiro extrato (extrato 1). A solução combinada dos extratos 1 e 2, ambos no mesmo recipiente de polipropileno de 2 mL, foi então levado para completa evaporação do solvente em banho Maria ( $\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). No teste com três extrações foi adicionado a fase aquosa mais uma alíquota de 1,2 mL de éter dietílico, seguido de agitação por 30 segundos em vortex e centrifugação por

10 min. Uma terceira alíquota foi recolhida (denominada extrato 3) e adicionado ao mesmo frasco da solução do extrato 1 e 2. Essa última fração de éter foi evaporado em banho Maria, seguida da redissolução do resíduo com 400 µL de acetonitrila. Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22 µm e 10 µL injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.9. Otimização da extração em fase sólida para extração de bixina de amostras de plasma**

Para a otimização da extração de bixina por extração em fase sólida (SPE) foram empregados cartuchos montados com seringas de polipropileno de 1 mL contendo um filtro (frit) superior e outro inferior de politetrafluor etileno (Teflon<sup>®</sup>) ambos com poros de 0,22 µm de diâmetro médio. Para a otimização dos parâmetros de SPE foi utilizado uma bomba peristáltica Ismatec e tubulações de Viton<sup>®</sup> de 1 mm de diâmetro em numa vazão aproximada de 1 mL min<sup>-1</sup> ( $\pm 0,1$  mL min<sup>-1</sup>). Com essas condições foram avaliados os parâmetros de SPE descritos a seguir.

#### **3.9.1. Avaliação do tipo de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma**

Neste estudo foram avaliados seis tipos diferentes de fase estacionária: Strata C18T (55 µm, 140A, Phenomenex); Strata C8 (55 µm, 140A, Phenomenex); HFC8 (Agilent); StrataX (33 µm, Phenomenex); Oasis HLB (30 µm, 80A, Waters). Strata Phenyl (50 µm, 65A Phenomenex). Os cartuchos foram montados empregando 80 mg dos sorventes descritos.

As amostras de plasma foram preparadas em tubos de polipropileno de 2 mL fortificando 400 µL de plasma com 12 µL de solução de bixina (97 µg mL<sup>-1</sup>) e 20 µL

de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de diluição com  $400 \mu\text{L}$  de água deionizada.

O procedimento de SPE foi realizado em quatro etapas descritas a seguir:

- Condicionamento do cartucho: uma alíquota de  $400 \mu\text{L}$  de MeOH seguida de duas alíquotas de  $500 \mu\text{L}$  de água deionizada;
- Amostragem:  $800 \mu\text{L}$  da amostra de plasma diluída com água deionizada (1:1/v:v);
- Limpeza (*clean up*): uma única alíquota de  $800 \mu\text{L}$  de água;
- Eluição: duas alíquotas de  $600 \mu\text{L}$  de uma solução ACN:éter dietílico (1:1/ v:v).

Após a etapa de eluição o solvente do eluato recolhido foi reduzido a  $600 \mu\text{L}$  em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de  $0,22 \mu\text{m}$  e  $10 \mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### **3.9.2. Avaliação da massa de sorvente na extração de bixina**

Nesta avaliação foram montados cartuchos de SPE com 40, 80 e 120 mg de sorvente Strata C18T a base de sílica, com partículas de  $55 \mu\text{m}$ , tamanho médio de poro de  $140 \text{ \AA}$ . As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando  $400 \mu\text{L}$  de plasma com  $12 \mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e  $20 \mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de diluição com  $400 \mu\text{L}$  de água deionizada.

O procedimento de SPE foi realizado em quatro etapas descritas a seguir:

- Condicionamento do cartucho: 200, 300 e  $400 \mu\text{L}$  de MeOH foram percolados para os cartuchos contendo 40, 80 e 120 mg sorvente, respectivamente, seguido de duas alíquotas de  $500 \mu\text{L}$  de água deionizada;

- Amostragem: um volume de 800  $\mu\text{L}$  da amostra de plasma diluído com água deionizada (1:1/v:v) foi introduzida no cartucho;
- Limpeza (*clean up*): uma única alíquota de 800  $\mu\text{L}$  de água deionizada foi percolada nos cartuchos;
- Eluição: duas alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  de uma solução ACN:éter dietílico (1:1, v/v) foram percolados nos cartuchos.

Após a etapa de eluição o solvente do eluato recolhido foi reduzido a 600  $\mu\text{L}$  em banho Maria ( $\approx 40\text{ }^\circ\text{C}$ ). Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores.

### 3.9.3. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma e na etapa de limpeza sobre a extração de bixina

Para este estudo foi empregada uma solução de cloreto de sódio (20 % m/v) adicionada na amostra de plasma e também durante a etapa de limpeza. As amostras de plasma foram fortificadas foram separadas em quatro grupos distintos como descrito na Tabela 5.

**Tabela 5:** Grupos de condições avaliadas no estudo do efeito da adição de sal na porcentagem de extração da bixina por SPE.

Experimento	Descrição
1	Amostra diluída com água e limpeza com água (SA)
2	Amostra diluída com NaCl e limpeza com NaCl (SO1)
3	Amostra diluída com água e limpeza com NaCl (SO2)
4	Amostra diluída com NaCl e limpeza com água (SO3)

SA = sem adição de sal; SO = grupo *salting out*.

Nesta avaliação os cartuchos foram montados com 80 mg de sorvente Strata C18T a base de sílica C18.

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400  $\mu\text{L}$  de plasma com 12  $\mu\text{L}$  de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de diluição com 400  $\mu\text{L}$  de água deionizada.

O procedimento de SPE foi realizado em quatro etapas descritas a seguir:

- Condicionamento do cartucho: uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de MeOH foi percolada seguida de duas alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de água deionizada;
- Amostragem: 800  $\mu\text{L}$  de amostra de plasma diluída (diluição com solução de cloreto de sódio ou água deionizada);
- Limpeza (*clean up*): uma única alíquota de 800  $\mu\text{L}$  de água deionizada ou solução de cloreto de sódio;
- Eluição: duas alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  de uma solução ACN:éter dietílico (1:1, v/v).

Após a etapa de eluição o solvente do eluato recolhido foi reduzido a 600  $\mu\text{L}$  em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{L}$  injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores

#### **3.9.4. Avaliação do solvente de eluição na extração de bixina**

Neste estudo foram avaliadas diferentes composições do solvente de eluição. Foram avaliados quatro diferentes sistemas de eluição descrito na Tabela 6.

**Tabela 6:** Sistemas de eluição avaliados na etapa de eluição para a extração da bixina de amostras de plasma por SPE.

Experimento	Descrição
1	Duas alíquotas de 600 µL de uma solução ACN:éter dietílico (1:1/v:v)
2	Única alíquota de 400 µL de ACN
3	Uma primeira alíquota de 600 µL de uma solução ACN:éter dietílico (1:1/ v:v) seguida de uma segunda alíquota de 600 µL de éter dietílico
4	Uma primeira alíquota de 400 µL de ACN seguida de uma segunda alíquota de 600 µL de éter dietílico

ACN = acetonitrila.

Nesta avaliação os cartuchos foram montados com 80 mg de sorvente Strata C18T a base de sílica C18.

As amostras de plasma foram preparadas em tubo de polipropileno de 2 mL fortificando 400 µL de plasma com 12 µL de solução de bixina ( $97 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 20 µL de solução de metformina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de diluição com 400 µL de água deionizada.

O procedimento de SPE foi realizado em quatro etapas descritas a seguir:

- Condicionamento do cartucho: uma alíquota de 400 µL de MeOH foi percolada seguida de duas alíquotas de 500 µL de água deionizada;
- Amostragem: 800 µL de amostra de plasma diluído;
- Limpeza (*clean up*): uma única alíquota de 800 µL de água deionizada ou solução de acetato de amônio;
- Eluição: conforme descrito na Tabela 5.

Após a etapa de eluição o solvente do eluato recolhido foi reduzido ao volume total de ACN na amostra de eluição em banho Maria ( $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Finalmente as amostras foram filtradas em filtro de poro de 0,22 µm e 10 µL injetados no cromatógrafo.

O cálculo para os valores de porcentagem de extração foram realizados empregando a Equação 05 descrita no item 3.7.1.

Os resultados de porcentagem de extração foram calculados comparando amostras de plasma fortificadas antes da etapa de extração e o extrato livre de metformina (branco) fortificado após a extração.

Para cada condição avaliada foram realizadas duas extrações ( $n = 2$ ) e os valores de porcentagem de extração são apresentados como a média desses valores

### **3.10. Determinação dos parâmetros de validação do método**

A validação de um método desenvolvido é de fundamental importância para demonstrar a sua confiabilidade, uma vez que os resultados obtidos de uma análise podem ter consequências graves. Para validar um método deve-se seguir alguns procedimentos que envolvem a avaliação de determinados parâmetros descritos em diversos protocolos oficiais e artigos da área.

Neste trabalho dado as grandes diferenças físico-químicas dos analitos de interesse foram validados dois métodos distintos de análise, um para a bixina e outro para a metformina. O método de determinação de bixina em plasma de rato empregou extração líquido-líquido e UHPLC-PDA como técnica instrumental de análise e o segundo método para determinação de metformina em plasma de rato empregou a precipitação proteica e UHPLC-MS/MS como sistema instrumental de análise. Foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, exatidão e limite de quantificação. As principais figuras de mérito de validação foram avaliadas tomando como referência o guia de validação do FDA – *Food and Drug Administration* [127].

Devido ao fato dos analitos terem apresentado comportamentos cromatográficos praticamente antagônicos, foi necessário fazer ajustes nas condições no método cromatográfico que serão descritos nos itens a seguir.

#### **3.10.1. Condições cromatográficas para determinação de bixina**

A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica Acquity UHPLC® BEH C18 (50 x 2,1mm; 1,7 µm) acoplada a uma coluna de guarda de 0,5 cm de mesma fase estacionária e um filtro de coluna de 0,2 µm. A eluição foi realizada com (A) ácido fórmico 0,1% (v/v) em água deionizada e (B) ACN no modo gradiente de eluição. O gradiente utilizado foi: 0-4,00min, 98-2% (A); 4,00-5,00 min, 2% (A); 5,00-5,10 min, 2-98% (A); 5,10-6,50 min, 98% (A). A vazão da fase móvel foi mantida em 0,4 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas da coluna e do amostrador foram de 40 e 20 °C, respectivamente. O volume de injeção foi de 10,0 µL.

O detector de arranjo de fotodiodos foi empregado no modo varredura do espectro na faixa de 200 a 650 nm com resolução de 4,8 nm. O modo de ionização empregado foi o de eletronebulização no modo positivo. A temperatura de dessolvatação foi de 400 °C com uma vazão de 600 L min<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>. A temperatura de bloco foi mantida em 150 °C, a vazão de N<sub>2</sub> do cone foi de 25 L min<sup>-1</sup> e a voltagem do capilar de 5,0 kV. A análise dos dados foi realizada utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters).

### **3.10.2. Condições cromatográficas para determinação de metformina**

A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica Acquity UHPLC® HSS C18 (100 x 2,1 mm; 1,8 µm) com uma coluna de guarda de mesma fase estacionária e um filtro de coluna. A eluição foi realizada com (A) NH<sub>4</sub>Ac 20 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada e (B) 0,5% ácido fórmico em ACN no modo gradiente de eluição. O gradiente utilizado foi: 0-1 min, 99% (A); 1,00-1,01 min, 99-0% (A); 1,01-1,50 min, 0% (A); 1,50-1,51 min, 0-99% (A); 1,51-3,00 min, 99% (A). A vazão da fase móvel foi mantida em 0,300 ml min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna e do amostrador foram mantidos a 30 °C. O volume de injeção foi de 5,0 µL.

O ESI foi utilizado para análise no modo positivo. A temperatura de dessolvatação foi de 450 °C com uma vazão de 650 L min<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>. A temperatura de bloco foi mantida em 150 °C, a vazão de N<sub>2</sub> do cone foi de 10 L min<sup>-1</sup>, a voltagem do capilar de 2,5 kV. A análise dos dados foi realizada utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters).

### **3.10.3. Seletividade**

A seletividade é a capacidade do método de determinar exatamente o composto de interesse na presença de interferentes da matriz. Para avaliação da seletividade, deve-se comparar o extrato da matriz branco com o extrato da matriz fortificado. Assim verifica-se a existência ou não de algum interferente da matriz no mesmo tempo de retenção do composto de interesse [128]. Para essa avaliação o branco deve ser avaliado em replicata (n=6).

#### 3.10.4. Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade e a faixa linear de trabalho foram avaliadas construindo uma curva analítica adicionando concentrações conhecidas de metformina e bixina ao plasma seguido da extração. Foi utilizado oito níveis de concentração para cada composto com um mínimo de três extrações (triplicata) para cada concentração. Para a bixina o plasma foi fortificado nas concentrações de 200; 400; 600; 800; 1200; 1500; 1800 e 2200 ng mL<sup>-1</sup>. Para a metformina foi o plasma fortificado nas concentrações de 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 ng mL<sup>-1</sup>. Após a extração, as áreas correspondentes ao sinal dos compostos de interesse foram inseridos em um gráfico de área vs concentração. Através de um modelo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários, foi obtida uma equação que descreve uma relação linear do tipo  $y = ax + b$  em que  $a$  é o coeficiente angular,  $b$  o coeficiente linear,  $y$  é o sinal analito (área) e  $x$  a concentração do analito. O coeficiente de correlação é um bom indicativo ajuste do modelo em uma determinada faixa de concentração.

#### 3.10.5. Exatidão

A exatidão de um método está relacionada com a proximidade do teor do composto de interesse encontrado na amostra com a concentração teórica esperada. Esse ensaio foi realizado por meio do teste de recuperação em que se compara o resultado obtido da Equação 06 com o valor teórico.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Valor de concentração obtido}}{\text{Valor de concentração teórico}} \times 100 \quad \text{Equação 06}$$

O branco de plasma foi fortificado em três níveis de concentração diferentes em quintuplicata ( $n=5$ ) para cada nível. Para a bixina foi avaliada as concentração de 300, 1000 e 2000 ng mL<sup>-1</sup>. Para a metformina foi avaliada as concentrações 10, 150 e 450 ng mL<sup>-1</sup>. Após fortificar o plasma nestas concentrações, realizou se a extração e os sinais de área obtidos foram aplicados na equação da regressão linear para obter o valor de concentração.

#### 3.10.6. Precisão

A precisão do método verifica se há proximidade dos resultados da análise de amostra homogêneas analisadas em replicara em um determinado nível de concentração. Neste ensaio verificasse a variação das medidas feitas em um dia

(precisão) e em dias diferentes (precisão intermediária) sendo avaliados três níveis de concentrações em quintuplicata (n=5). O resultado da precisão é dado em função do coeficiente de variação (CV) (Equação 07).

$$CV (\%) = \frac{S}{C_m} \times 100 \quad \text{Equação 07}$$

Em que S é o desvio padrão dos valores obtidos e C<sub>m</sub> a concentração média obtida. Para a precisão intermediária foi feita a análise em três dias diferentes pelo mesmo analista e o mesmo equipamento. Para a bixina foram avaliados os níveis de concentração de 400, 1200 e 2200 ng mL<sup>-1</sup>. Para a metformina foram avaliados os níveis de concentração de 25, 200 e 500 ng mL<sup>-1</sup>.

### **3.10.7. Limite de quantificação**

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade de composto de interesse que pode ser determinado pelo método proposto com precisão e exatidão aceitáveis. Esse parâmetro é determinado pela Equação 08 que leva em consideração parâmetros obtido pela curva de calibração.

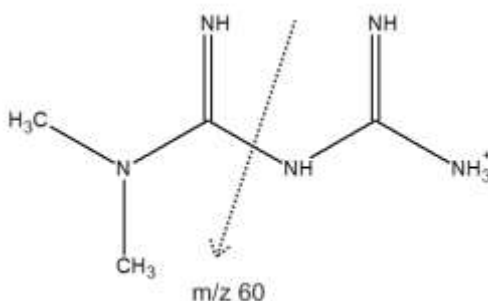
$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 08}$$

Em que s é o desvio padrão do branco medido em seis réplicas (n=6) e S é o valor da inclinação da curva de calibração.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Otimização das condições cromatográficas, arranjo de diodo e espectrometria de massas

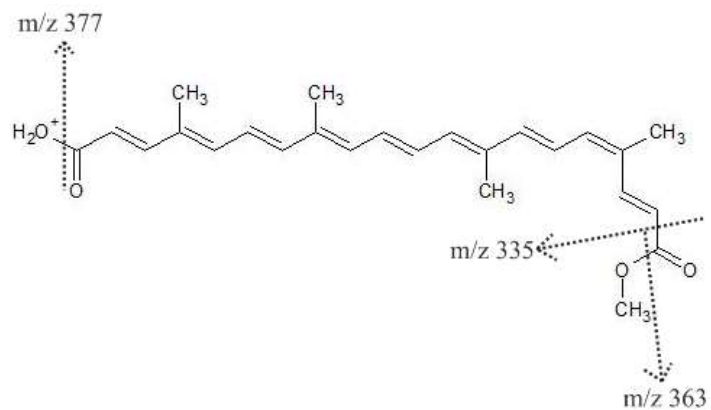
A otimização da cromatografia líquida acoplada ao detector de absorvância com arranjo de fotodiodos e espectrometria de massas foi de extrema importância para aumentar a detectabilidade do método. A quantificação da metformina foi realizada utilizando-se o fragmento de maior intensidade. Para a metformina usou-se o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  130 como íon precursor e para a fragmentação a transição de quantificação foi feita pela transição  $130 \rightarrow 60$  com energia do cone de 28 V e colisão de 10 V. A confirmação foi realizada pela transição  $130 \rightarrow 71$  com energia do cone de 28 V e colisão de 18 V. Na Figura 9 é apresentado o local de quebra da metformina, sendo esses fragmentos já descritos na literatura [92, 95, 100, 101, 106, 108, 126]. Foi utilizado o modo de janela de detecção em que a metformina foi monitorada entre 0 e 2,50 min. O tempo de retenção da metformina foi de 1,06 min (Figura 11).



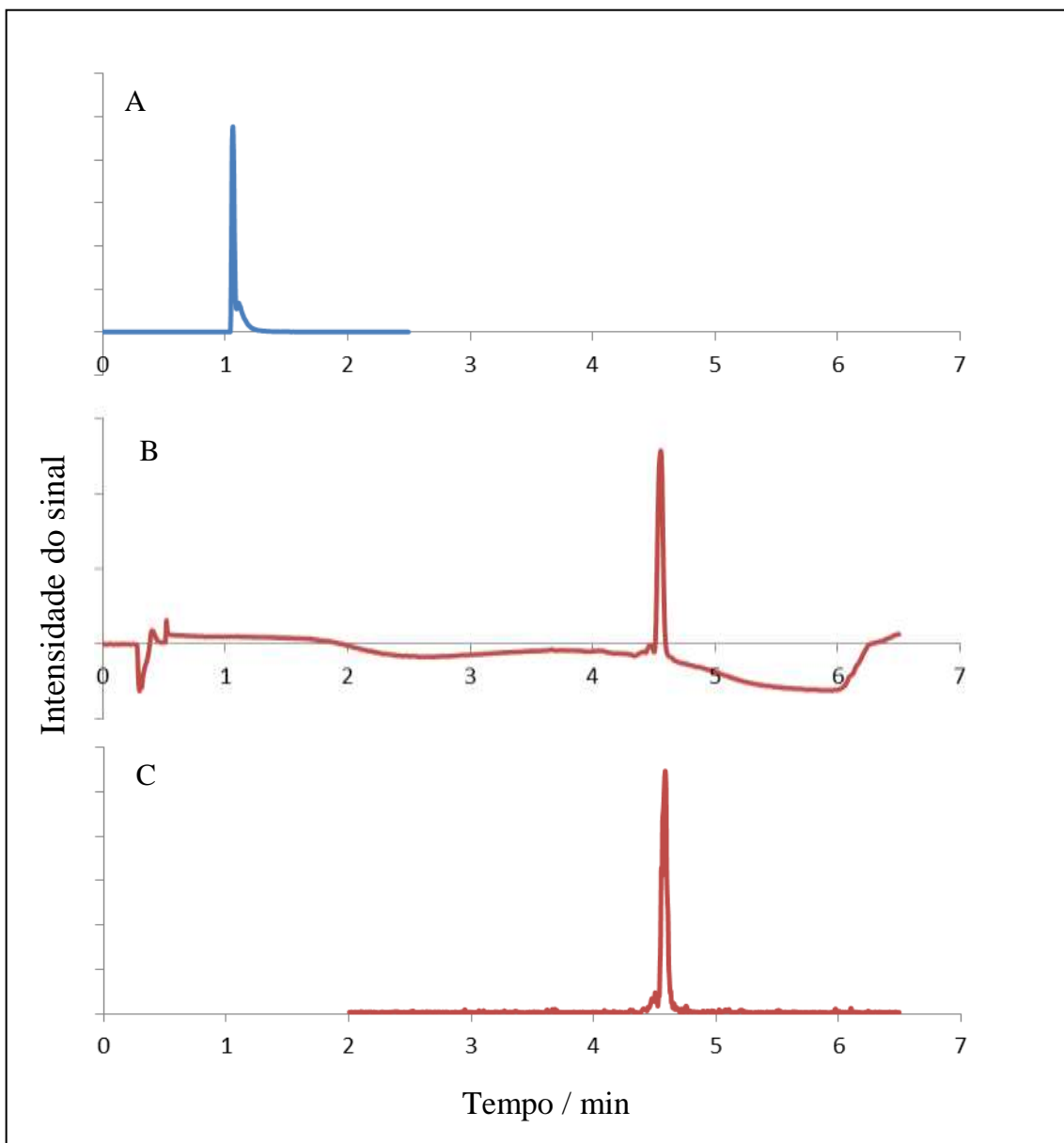
**Figura 9:** Estrutura da metformina e fragmentos do íons monitorados.

Para a bixina foi utilizado o comprimento de onda de máximo de absorvância no visível (459 nm). No espectrômetro de massas foi utilizada o íon precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  395 e a transição de quantificação da bixina foi a de  $395 \rightarrow 363$  com a voltagem do cone de 24 V e colisão de 8 V. A transição de confirmação foi a  $395 \rightarrow 335$  com voltagem do cone de 24 V e colisão de 8 V. Essas transições utilizadas no espectrômetro de massas (Figura 10) e o comprimento de onda me máximo de absorção foram baseados em trabalhos descritos na literatura [57, 129-132]. O tempo de retenção

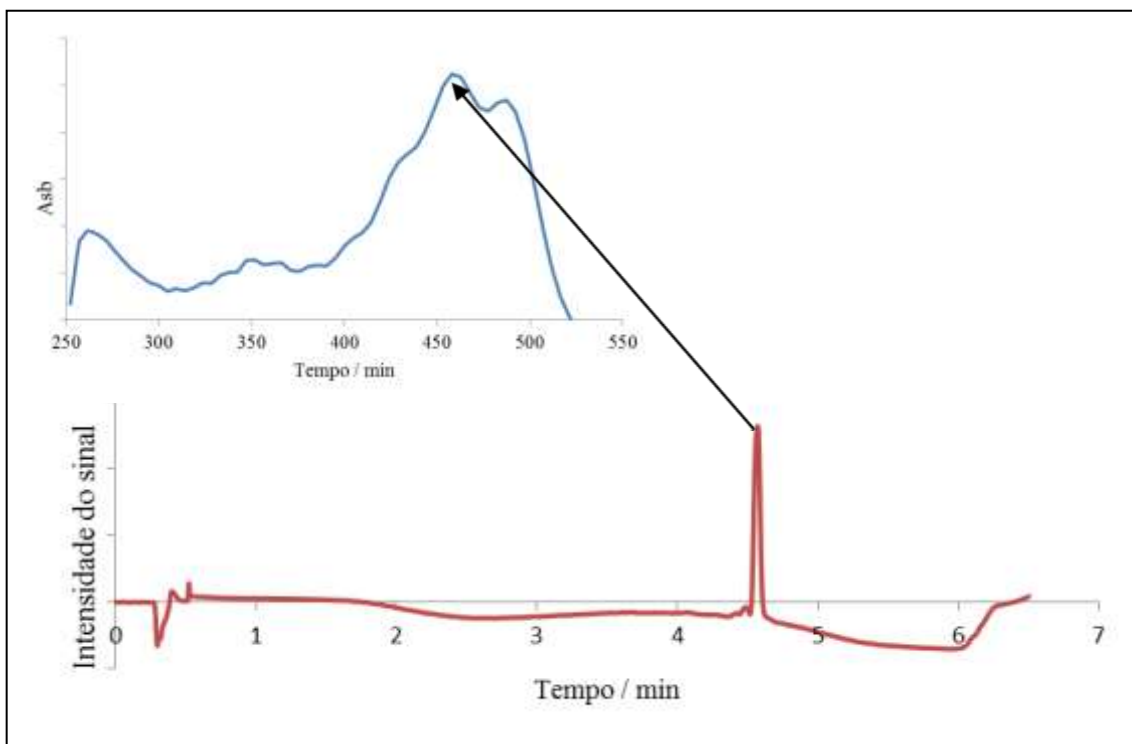
da bixina foi de 4,57 min (Figura 11). Na Figura 12 podemos observar o espectro de absorção do pico cromatográfico correspondente à bixina.



**Figura 10:** Estrutura da bixina e fragmentos dos íons monitorados.



**Figura 11:** Cromatograma das injeções de solução padrão de metformina(A) ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por espectrometria de massas sequencial ( $m/z \ 130 \rightarrow 60$ ), solução padrão de bixina (B) ( $2500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por absorvância com detector com arranjo de fotodiodos e solução padrão de bixina (C) ( $2500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por espectrometria de massas ( $m/z \ 395 \rightarrow 363$ ).



**Figura 12:** Cromatograma da injeção de solução padrão de bixina ( $2200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com destaque para o espectro de absorção no tempo de retenção (4,57 min).

#### 4.2. Avaliação das colunas cromatográfica

O resultado da avaliação das diferentes colunas cromatográficas de fase reversa estão apresentados na Tabela 7. Nesta tabela podemos observar que a coluna a base de sílica modificada com grupos fenil foi a que apresentou o resultado mais satisfatório, pois esta teve os maiores valores de fator de retenção e números de pratos teóricos para metformina. Pode-se atribuir a alta retenção as interações com silanóis livres uma vez que o comprimento do grupo fenil quimicamente ligado possui um comprimento menor em relação ao C18, tornando o acesso aos grupos silanóis livres mais fácil. Outra coluna que apresentou bons resultados foi à coluna HSS C18 SB. Nesta coluna a maior retenção da metformina também poderia ser atribuída à forte interação com grupos silanóis resíduas devido à falta de capeamento do grupo ligado quimicamente a sílica. Em geral o capeamento de colunas de fase reversa é empregado para diminuir a interação de analitos básicos com silanóis livres por impedimento estérico, que no caso de compostos muito hidrossolúveis e pouco retidos o efeito é uma perda de retenção significativa [113, 133]. A coluna HSS C18 SB apresentou uma alta dispersão da bixina, fazendo com que não obtivéssemos um sinal mensurável. A coluna HSS T3 possui características semelhantes à HSS C18, entretanto ela possui menor densidade de

ligante e menor porcentagem de carbono, fazendo com que o acesso a silanóis livres seja maior. A coluna da família BEH (*ethylene bridged hybrid*) C18 é uma coluna que possui ponte de pontes de etileno entre os silícios no suporte da coluna. A presença desses grupos etilenos diminui a presença de grupos silanóis tornando-a menos retentiva para compostos básicos e ainda mais estáveis ao ataque de álcalis. A principal diferença entre as colunas HSS e a BEH é que o suporte da coluna HSS é basicamente óxido de silício, enquanto que o suporte da coluna BEH é composta pelas chamadas sílicas híbridas. Para o caso particular da metformina que possui baixa afinidade pelos grupos apolares a maior presença de grupos silanóis auxilia na sua retenção [134].

**Tabela 7:** Parâmetros cromatográficos de separação obtidos nas diferentes colunas cromatográficas avaliadas.

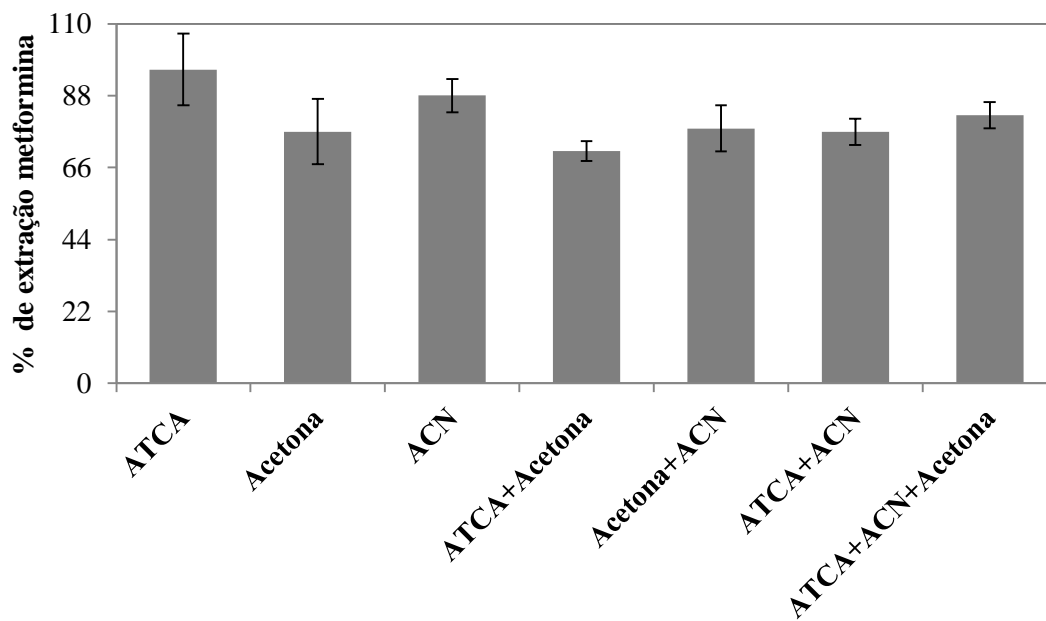
Coluna	Metformina			Bixina		
	$k$	$N$	$t_R$	$k$	$N$	$t_R$
BEH C18	0,2	115	0,88	5,9	38109	5,21
Phenyl	2,6	205	1,34	14,5	46276	5,74
HSS T3	2,0	115	1,12	13,7	33284	5,42
HSS C18	1,3	416	1,73	6,8	47292	5,80
HSS C18 SB	10,9	5741	4,39	*	*	*

$k$  = fator de retenção;  $N$  = número de pratos;  $t_R$  = tempo de retenção.

### 4.3. Avaliação dos parâmetros para extração de metformina por precipitação proteica

#### 4.3.1. Avaliação do tipo de agente precipitante na extração de metformina

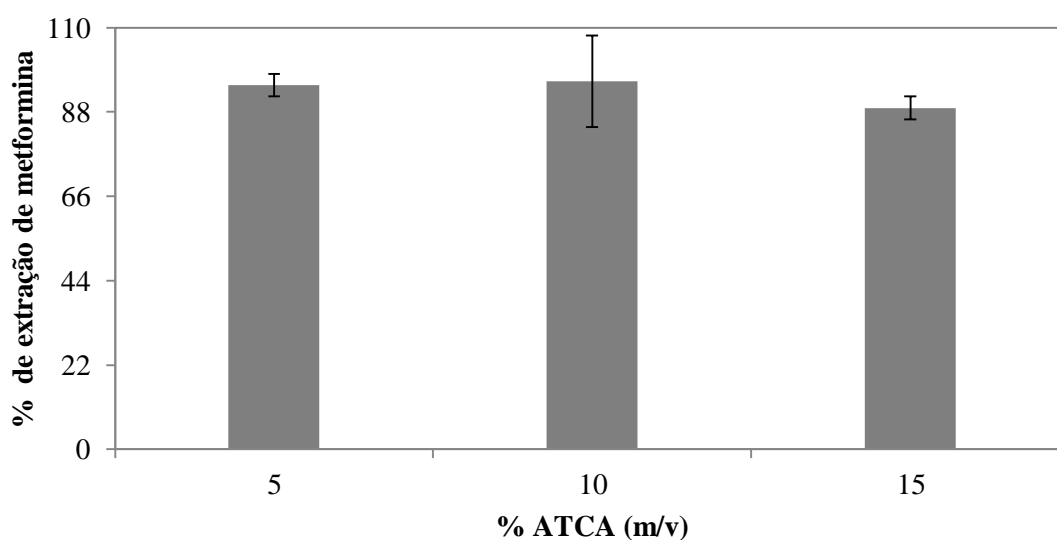
Três diferentes agentes precipitantes foram avaliados na precipitação das proteínas de plasma para determinação de metformina (Figura 13). Apesar de a acetonitrila ser amplamente utilizada como agente precipitante, o ácido tricloroacético (ATCA) foi o que obteve maior porcentagem de extração da metformina (Figura 13). Um dos possíveis motivos do melhor rendimento empregando o ATCA pode ser atribuída à ionização das proteínas que se tornaram catiônicas e conseqüentemente arrastaram menos metformina para o precipitado.



**Figura 13:** Avaliação do tipo de agente precipitante (ATCA, acetona e acetonitrila) na porcentagem de extração de metformina em amostras de plasma.

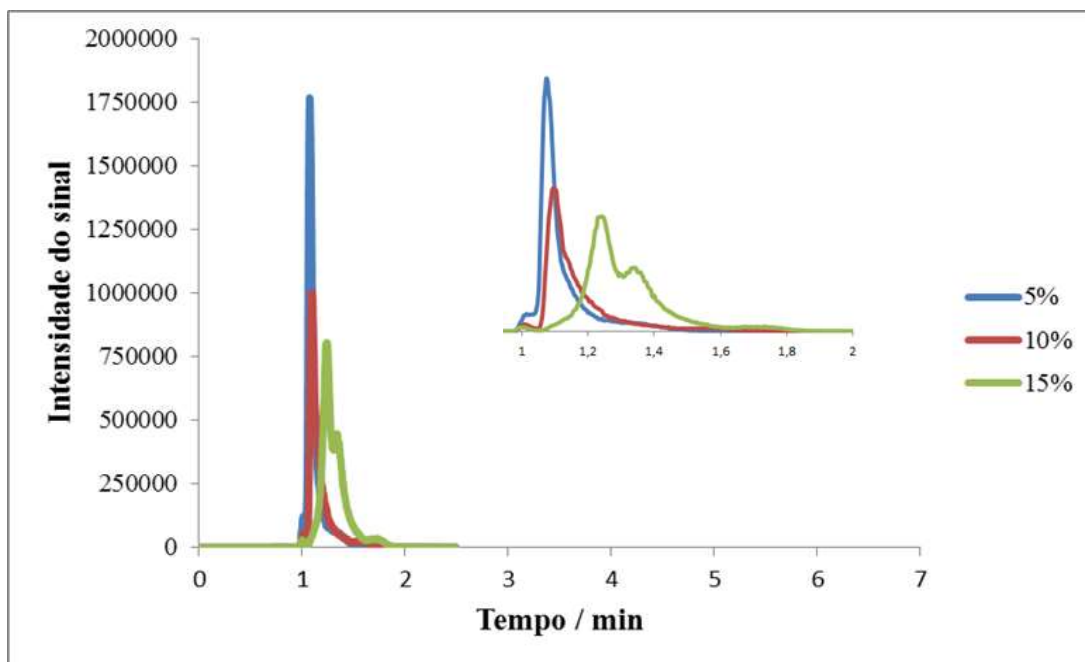
#### 4.3.2. Otimização da concentração do ácido tricloroacético na extração de metformina

Outro parâmetro avaliado foi a concentração de ATCA empregado para a precipitação das proteínas do plasma. Foram avaliados três concentrações de ATCA na solução de precipitação (5, 10 e 15% m/v). Nos resultados da Figura 14 podemos observar na faixa de concentração avaliada não houve mudança aparente na porcentagem de extração da metformina. Em todos os casos a porcentagem de extração média foi superior a 90%.



**Figura 14:** Avaliação do teor de agente precipitante (5, 10 e 15% m/v) na porcentagem de extração de metformina em amostras de plasma.

Apesar dos resultados de porcentagem de extração indicarem que não houve diferença aparente entre os teores de ATCA quando observarmos os cromatogramas referentes a estas análises (Figura 15) é possível notar que o formato do pico da metformina se altera com o aumento da concentração do agente precipitante. Dessa forma optou-se por empregar a concentração de 5% do agente precipitante ATCA.



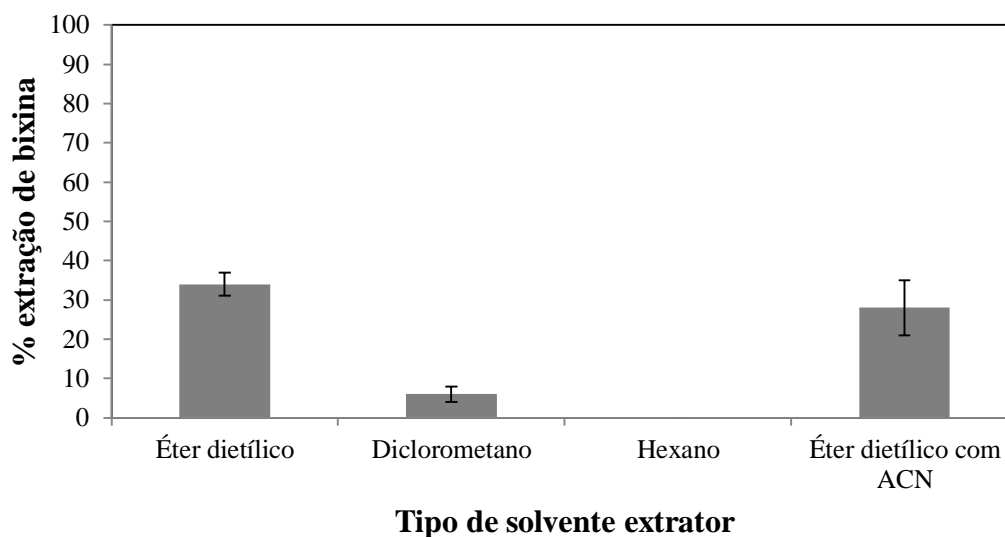
**Figura 15:** Cromatogramas demonstrando a distorção no formato do pico da metformina após a extração por precipitação proteica empregando o agente precipitante ácido tricloroacético em diferentes concentrações (5, 10 e 15%, m/v).

#### 4.4. Otimização da extração líquido-líquido para extração de bixina nas amostras de plasma

##### 4.4.1. Avaliação do tipo de solvente extrator na extração de bixina

A escolha do tipo de solvente é extremamente importante em procedimentos de extração líquido-líquido, pois o analito de interesse deve ter elevada solubilidade no solvente orgânico escolhido para que haja uma extração eficiente. Podemos perceber que o éter dietílico foi o que obteve maior porcentagem de extração de bixina (Figura 16). Podemos atribuir a maior porcentagem de extração do éter a possível ligação de hidrogênio em que o oxigênio do éter faz com o hidrogênio da bixina, visto que o éter possui um caráter mais básico em relação aos outros solventes. O diclorometano possui um caráter anfótero quando avaliado em termos de acidez, por isso possui valor de extração maior que o do hexano [135]. Comparando a solubilidade do éter ( $69 \text{ g L}^{-1}$ ), do diclorometano ( $13 \text{ g L}^{-1}$ ) e do hexano (insolúvel), podemos verificar que a solubilidade do éter em água é maior. Essa maior solubilidade ajuda na transferência de bixina para a fase orgânica, fazendo assim o éter um melhor solvente para extração de bixina. A

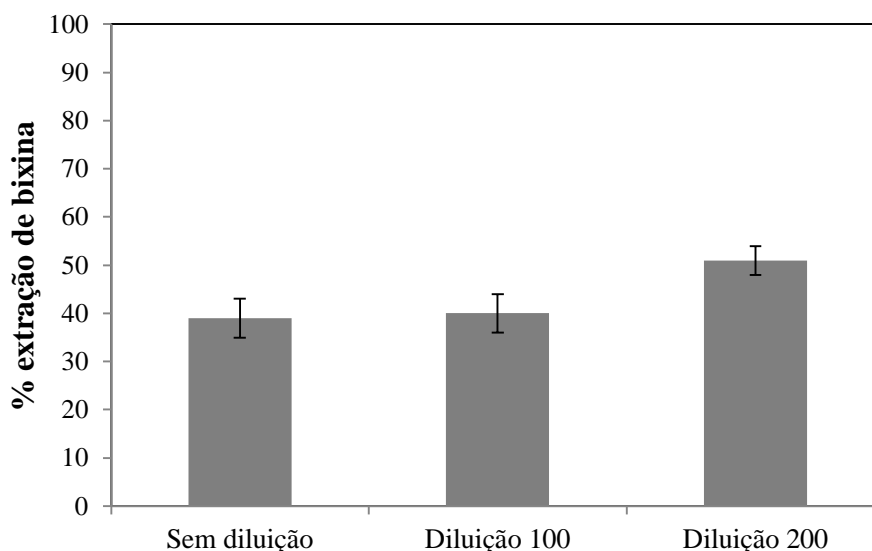
adição de acetonitrila ao éter praticamente não resultou em melhora na extração da bixina. Podemos atribuir isso ao fato da acetonitrila ser prontamente solúvel em água, logo ao entrar em contato com a fase aquosa ela se distribui preferencialmente na amostra aquosa e não auxilia na extração. Então o solvente escolhido para os próximos teste foi o éter dietílico.



**Figura 16:** Avaliação do tipo de solvente extrator (éter dietílico, diclorometano, hexano e éter dietílico:acetonitrila/5:2) na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido.

#### 4.4.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra de plasma na extração da bixina

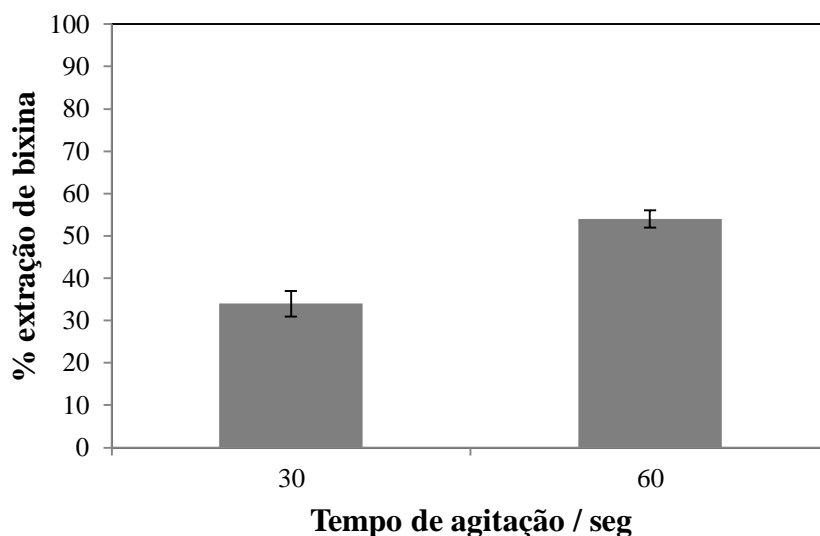
Outro parâmetro avaliado na extração líquido-líquido foi o efeito da diluição da amostra na porcentagem de extração de bixina em plasma de rato (Figura 17). Como podemos verificar que a adição de água ao plasma ajudou discretamente a extração da bixina. Esse auxílio pode ser atribuído a uma redução da interação bixina-proteína ou bixina-endógenos tornando a bixina mais amplamente disponível para extração. Esse tipo de efeito já foi amplamente descrito e avaliado em outros procedimentos de equilíbrio como a SPME[136]. Então não foi utilizada a diluição do plasma na extração de bixina.



**Figura 17:** Avaliação da diluição do plasma na porcentagem de extração de bixina na extração líquido-líquido. Sem diluição = sem diluição dos 400  $\mu\text{L}$  de plasma com água deionizada; diluição 100 = 400  $\mu\text{L}$  de plasma diluído com 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada; diluição 200 = 400  $\mu\text{L}$  de plasma diluído com 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada.

#### 4.4.3. Avaliação do tempo de agitação entre a amostra de plasma e o solvente extrator na extração da bixina

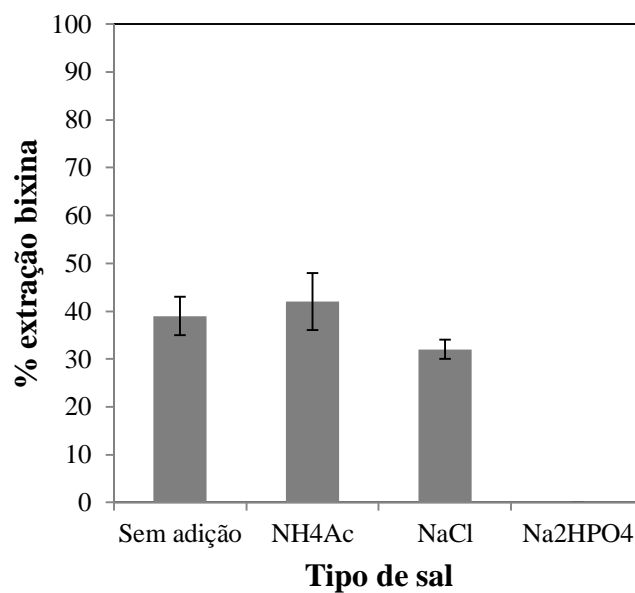
O tempo de agitação também é importante na extração líquido-líquido, em função da preferência por realizar o procedimento em regime de equilíbrio do analito entre as duas fases onde se obtém o maior rendimento de extração. Quanto maior o tempo de agitação espera-se haver maior extração até que se atinja um máximo, assinalando que o equilíbrio de partição foi atingido. Na Figura 18 observa-se que com maior tempo de agitação houve uma maior porcentagem de extração. Essa maior porcentagem de extração certamente pode ser atribuída ao maior tempo de contato entre a bixina e a fase orgânica, resultando em uma maior transferência de massa do analito da amostra para o solvente extrator. Logo o tempo utilizado para extração foi de 60 segundos.



**Figura 18:** Avaliação do tempo de agitação na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido.

#### **4.4.4. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma na extração da bixina**

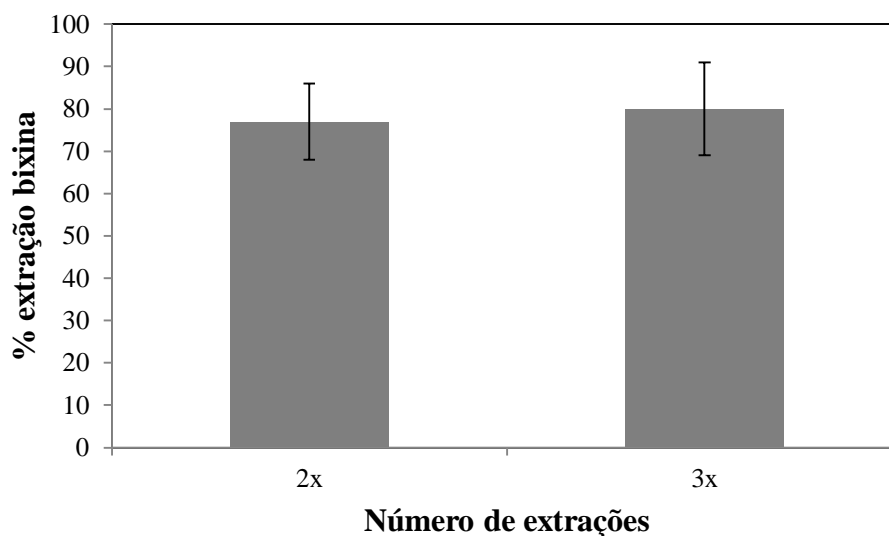
A adição de sal na fase aquosa pode auxiliar na extração líquido-líquido. Com a adição de sal ocorre o aumento da quantidade de íons solvatados pela água da amostra (*salting out*), em que a água presente no meio solvata o sal diminuindo a solubilidade do analito na fase aquosa. Entretanto, podemos observar, na Figura 19, que a adição de sal em alguns casos fez o efeito contrário, pois houve uma diminuição da porcentagem de extração. Uma possível explicação para essa observação seria o aumento da solubilidade do analito em fase aquosa devido a possível formação de um par iônico do sal adicionado com a bixina, tornando a bixina mais solúvel em água, sendo esse o efeito *salting in*, em que o aumento da força iônica gera o aumento da solubilidade de analito no meio.



**Figura 19:** Avaliação do efeito da adição de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (acetato de amônio)(20%, m/v),  $\text{NaCl}$  (20%, m/v) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10%, m/v) no plasma na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido.

#### 4.4.5. Extração líquido-líquido sequencial na determinação de bixina

Ao empregar a estratégia das extrações sequenciais espera-se um aumento na porcentagem de extração do analito de interesse como foi apresentado no item 1.4.2. Podemos observar na Figura 20, que com três extrações sucessivas obtivemos uma porcentagem de extração acima de 80%, valor desejado para o desenvolvimento do método.



**Figura 20:** Avaliação do número de extração na porcentagem de extração de bixina por extração líquido-líquido.

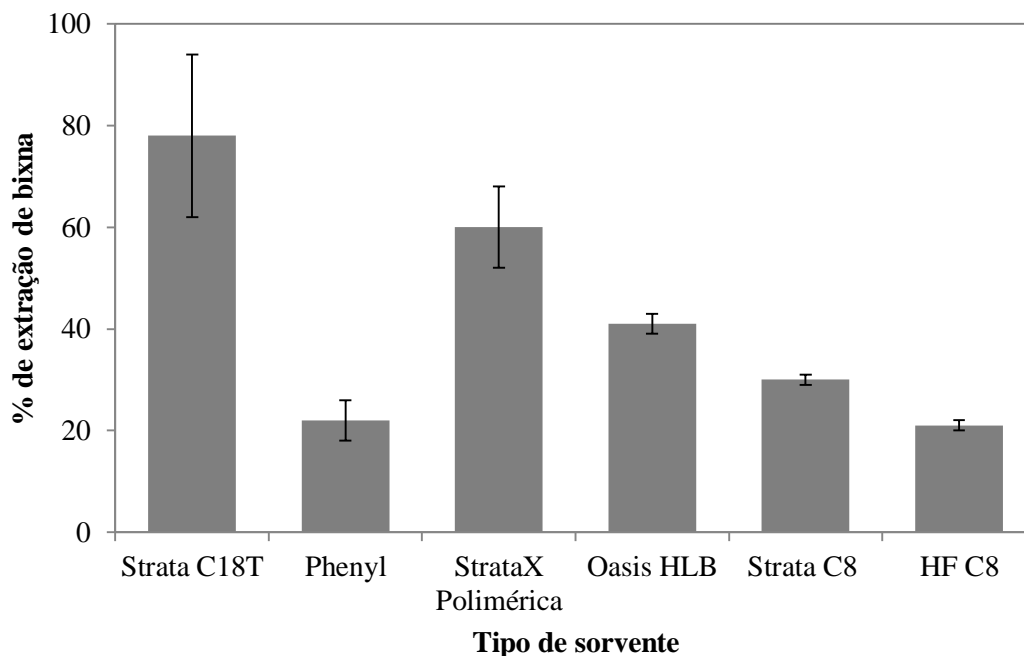
Com base nos resultados apresentados de otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido avaliados para bixina, as condições finais ótimas consistiram em utilizar 1,2 mL de éter dietílico, empregando 60 segundos de agitação e extração tripla sem adição de sal ou diluição da amostra.

#### **4.5. Otimização da extração em fase sólida para extração de bixina de amostras de plasma**

##### **4.5.1. Avaliação do tipo de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma**

No estudo do tipo de sorvente foram avaliadas seis fases diferentes. Podemos verificar nos resultados apresentados na Figura 21 que o sorvente Strata C18T foi o material que obteve maior valor de extração de bixina. A bixina é um composto que possui cadeia carbônica extensa e essa estrutura faz com que as interações hidrofóbicas fracas, do tipo dipolo induzido, com o grupo apolar C18 ligado quimicamente com a base de sílica seja maior comparativamente com as outras fases. A fase Strata X possui três tipos de interação em que o analito pode ficar retido, iônica com o grupo amino da ponta da cadeia, interação  $\pi$ - $\pi$  como grupo benzil, e interação hidrofóbica. Já a elevada

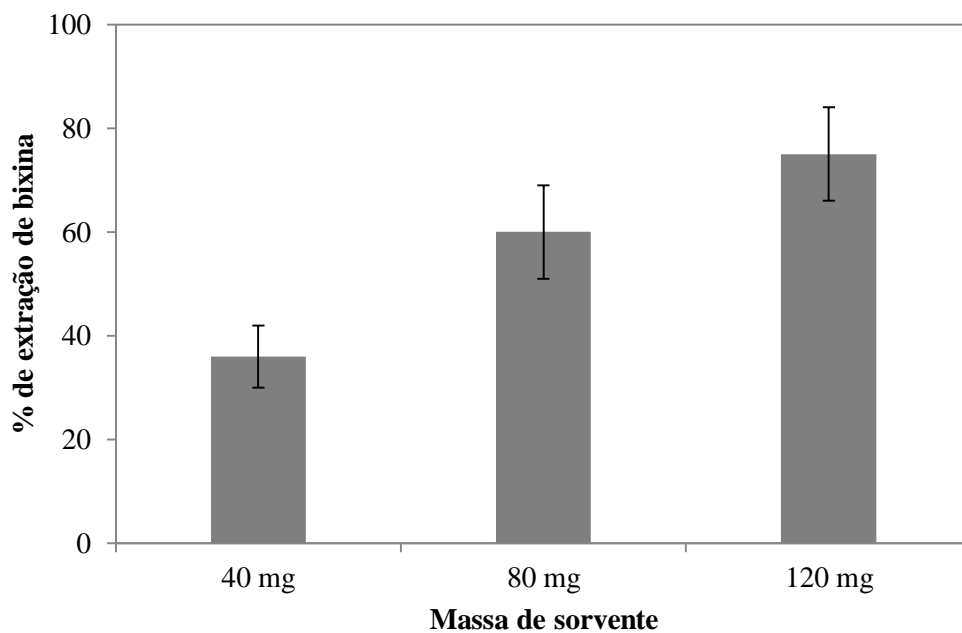
taxa de extração no cartucho de Strata X pode ser devido à interação da carboxila da bixina com os grupos amino da ponta da cadeia do polímero.



**Figura 21:** Avaliação do efeito do tipo de sorvente empregado na porcentagem de extração de bixina de amostras de plasma empregando a extração em fase sólida.

#### 4.5.2. Avaliação da massa de sorvente na extração de bixina de amostras de plasma

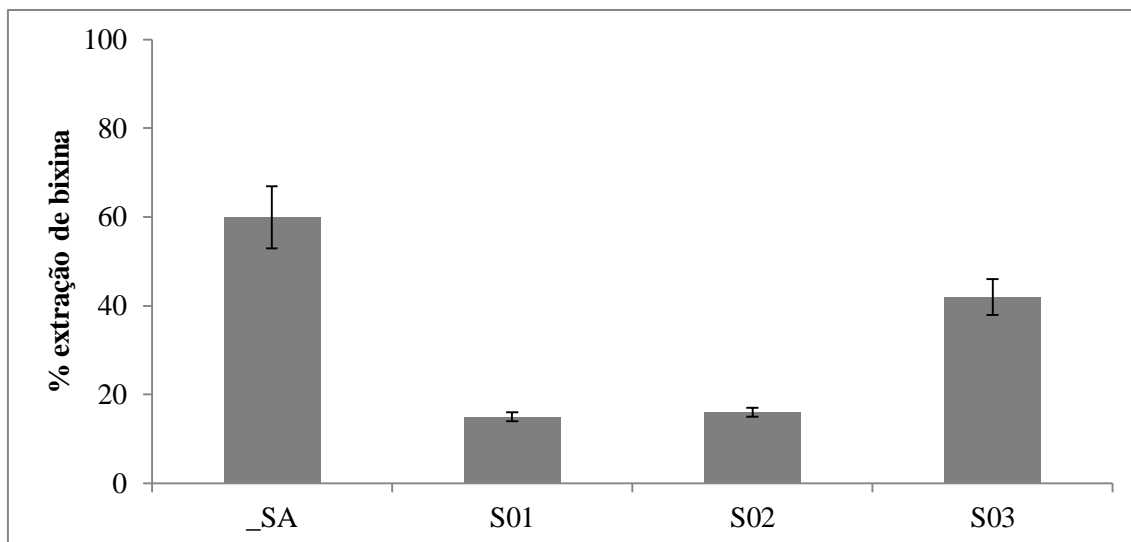
Para este parâmetro foram avaliadas três diferentes massas (40, 80 e 120 mg de fase estacionária Strata C18T) para a extração de bixina em plasma. Na Figura 22 podemos perceber que quanto maior a massa de sorvente maior a porcentagem de extração. Esse comportamento, como esperado, obedece aos princípios da cromatografia, pois quanto maior a massa menor a possibilidade de eluição do analito de interesse nas etapas de aplicação da amostra e lavagem.



**Figura 22:** Avaliação do efeito da massa de sorvente na porcentagem de extração de bixina de amostras de plasma empregando a extração em fase sólida.

#### **4.5.3. Avaliação da adição de sal na amostra de plasma e na etapa de limpeza sobre a extração de bixina**

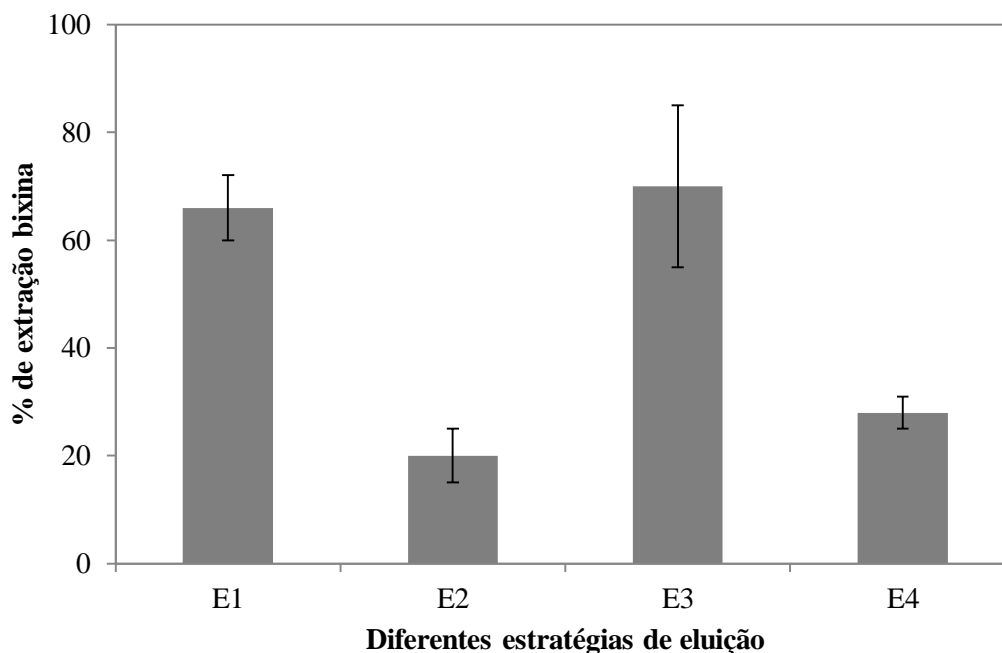
No estudo da adição de sal, podemos perceber nos resultados da Figura 23, que a adição de sal diminuiu a porcentagem de extração. Esse efeito pode ser explicado por dois fatores. Um deles pode ser o efeito inverso ao *salting out*, o efeito *salting in*, em que o aumento da força iônica aumenta a solubilidade do analito em fase aquosa fazendo com que o analito não fique retido no sorvete na aplicação da amostra. Outro fator pode estar relacionado ao forte efeito do *salting out*, em que a interação da bixina com o sorvete foi extremamente forte e, conseqüentemente, na etapa de eluição não foi possível eluir completamente o analito do cartucho.



**Figura 23:** Avaliação do efeito da adição de sal na etapa de diluição do plasma e *clean up* na porcentagem de extração de bixina em amostra de plasma empregando a extração em fase sólida. SA = sem adição de sal; S01 = adição de sal na diluição do plasma; S02 = Adição de sal da diluição do plasma e na etapa de *clean up*; S03 = adição de sal na etapa de *clean up*.

#### 4.5.4. Avaliação do solvente de eluição na extração de bixina

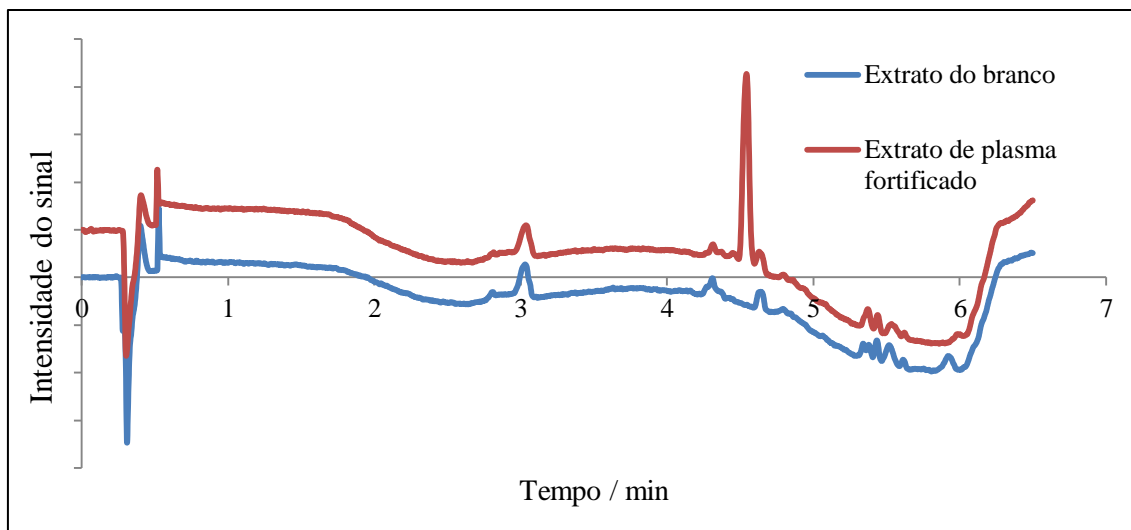
Na otimização da eluição (Figura 24) foi verificado que o teste de eluição E1 e E3 foram os que resultaram na maior porcentagem de extração. Pode-se associar essa maior porcentagem de extração ao maior teor de éter dietílico na fase extratora, uma vez que a bixina é um composto lipofílico. A mistura acetonitrila:éter (1:1) (E3) foi mais eficiente possivelmente devido a capacidade de interação da acetonitrila com a água residual proveniente da etapa anterior de *clean up* (lavagem).



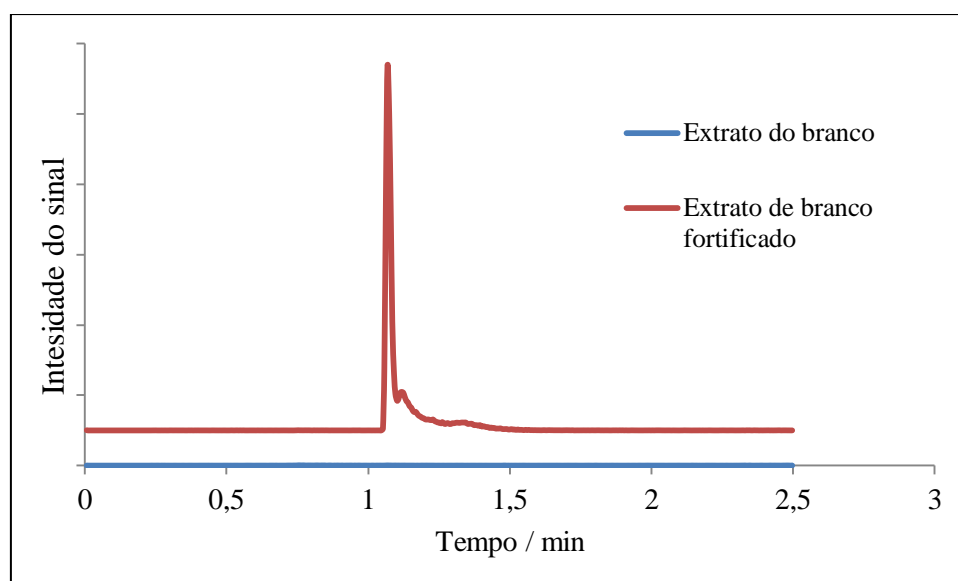
**Figura 24:** Avaliação de diferentes sistemas de eluição na extração de bixina em amostra de plasma empregando a extração em fase sólida. E1: 2 x 600 $\mu$ L ACN:éter dietílico (1:1, v/v); E2: 1 x 400  $\mu$ L ACN; E3: 1 x 600 $\mu$ L ACN:éter dietílico (1:1, v/v) + 1 x 600  $\mu$ L éter dietílico; E4: 1 x 400  $\mu$ L ACN + 1 x 600  $\mu$ L éter dietílico.

#### 4.1. Determinação das figuras de mérito de validação do método

A validação é uma etapa de extrema importância para dar credibilidade ao método desenvolvido. Nesta validação foram avaliados a seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, exatidão e limite de quantificação. A seletividade é importante para verificar se há a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. Podemos verificar que no tempo de retenção da bixina (4,57 min) e da metformina (1,06 min) não há nenhum composto endógeno coeluyente (Figuras 25 e 26).



**Figura 25:** Cromatogramas da injeção de bixina ( $2200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) adicionado em um extrato de plasma e um extrato de branco de plasma. O espectro Uv-Vis foi adquirido no comprimento de onda de 459 nm.



**Figura 26:** Cromatogramas da metformina ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) com detecção por espectrometria de massas sequencial ( $m/z \ 130 \rightarrow 60$ ) adicionado em um extrato de plasma e um extrato de branco de plasma.

A linearidade do método foi demonstrada para a faixa de concentração  $5\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$  para metformina e  $200\text{-}2200 \text{ ng mL}^{-1}$  para bixina ambos com coeficientes de correlação superiores a 0,99 o que comprova a capacidade preditiva do método. Os coeficientes angular (inclinação), coeficiente linear (intercepto) e o coeficiente de correlação ( $r$ ) obtidos pela regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários são

apresentados na Tabela 8. O limite de quantificação calculado pela Equação 08 apresentou coeficiente de variação de 15% para bixina e 13% para metformina, de acordo com o guia da FDA[127].

**Tabela 8:** Parâmetros da validação da bixina e metformina. Curva de calibração, faixa linear, coeficiente de correlação e limite de quantificação.

	Bixina	Metformina
Inclinação	0,040	70,22
Intercepto	0,501	-455,53
Faixa linear de trabalho (ng mL <sup>-1</sup> )	200-2200	5-500
Coeficiente de correlação (r)	0,997	0,998
Limite de quantificação (ng mL <sup>-1</sup> )	40	1

A precisão do método visa avaliar a dispersão dos resultados de uma determinada concentração. No ensaio da precisão foram avaliados três níveis de concentração em cinco leituras e o resultado é dado em termos de coeficiente de variação (CV) pela Equação 07. A precisão foi verificada em ensaio intra-dia (precisão) e inter-dia (precisão intermediária) em que as medidas são realizadas em três dias diferentes (Tabela 9).

**Tabela 9:** Valores de precisão para bixina e metformina.

Analito	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Intra-dia (CV%)	Inter-dia (CV%)
Bixina	400	8	8
	1200	4	10
	2200	5	10
Metformina	25	6	8
	200	2	10
	500	3	8

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação para verificar se os valores obtidos foram próximos aos valores teóricos de concentração. No ensaio de exatidão foram avaliados três níveis de concentração em cinco leituras e três dias diferentes, sendo os resultados expressos em termos de porcentagem de recuperação (Equação 07)(Tabela 10). Podemos observar que os valores de recuperação obtidos foram próximos de 100% de acordo com o guia de validação da FDA, visto que a faixa aceitável é entre 80 e 120% [127].

**Tabela 10:** Valores de recuperação da exatidão para bixina e metformina.

Analito	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Bixina	300	103
	1000	100
	2000	105
Metformina	10	115
	150	101
	450	89

## 5. Conclusões

Um novo método para determinação de bixina por extração líquido-líquido com análise por UHPLC-DAD e metformina por precipitação proteica com análise por UHPLC-MS/MS foi desenvolvido e validado.

Foram avaliadas cinco colunas cromatográficas diferentes. A que obteve melhor resultado para a metformina foi à coluna de fase reversa a base de sílica C18, HSS C18 SB, entretanto devido a sua falta de capeamento, acredita-se que a retenção nessa coluna deveu-se exclusivamente por interações com os silanóis livres. A coluna de fase reversa a base de sílica fenil apresentou um resultado intermediário também provavelmente as interações com silanóis livres visto que o grupo ligado à sílica é menos volumoso comparativamente aos grupos C18, facilitando o acesso aos grupos silanóis.

Devidos às grandes diferenças físico-químicas entre a bixina e metformina, neste trabalho não foi possível desenvolver um método único para determinação destes compostos em plasma de rato. Por isso a SPE e ELL foram avaliadas para extração de bixina e precipitação proteica para extração de metformina.

No desenvolvimento do método para extração de bixina por ELL foram avaliadas à presença de sal no plasma, a diluição do plasma, o tempo de agitação, e o número de agitação. Os fatores presença de sal e diluição do plasma não demonstraram auxiliar de forma expressiva à extração de bixina nas faixas avaliadas.

No desenvolvimento do método para extração de metformina foi possível verificar que o ácido tricloroacético foi o que obteve melhor extração de metformina. Na avaliação da concentração, a menor concentração de ácido tricloroacético demonstrou ser melhor em termos de dispersão do pico cromatográfico.

Os métodos de ELL e precipitação proteica demonstraram ser adequados de acordo com os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão previsto pelo guia de validação do FDA.

## 6. Referências

- [1] F. Bouvier, O. Dogbo, B. Camara, Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto), *Science (New York, N.Y.)*, 300 (2003) 2089-2091.
- [2] C. Jako, C. Coutu, I. Roewer, D.W. Reed, L. Pelcher, P.S. Covello, Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis, *Plant Science*, 163 (2002) 141-145.
- [3] H.D. Preston, M.D. Rickard, Extraction and chemistry of annatto, *Food Chemistry*, 5 (1980) 47-56.
- [4] C.B. Castro, C.S. Martins, I.C. Falesi, R.F.R. Nazaré, O.R. Kato, R.L. Benchimol, M.M. Maués, *A cultura do Urucum*, 2º ed., Embrapa coleções técnicas, Brasília, 2009.
- [5] L. Tocchini, A.Z. Mercadante, Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos, *Food Science and Technology (Campinas)*, 21 (2001) 310-313.
- [6] I.J.O. Jondiko, G. Pattenden, Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*, *Phytochemistry*, 28 (1989) 3159-3162.
- [7] M.S. Barber, A. Hardisson, L.M. Jackman, B.C.L. Weedon, 316. Studies in nuclear magnetic resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixins, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (1961) 1625-1630.
- [8] A.Z. Mercadante, A. Steck, H. Pfander, Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds, *Phytochemistry*, 46 (1997) 1379-1383.
- [9] T. Ruiz-Anchondo, N. Flores-Holguin, D. Glossman-Mitnik, Natural carotenoids as nanomaterial precursors for molecular photovoltaics: a computational DFT study, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (2010) 4490-4510.
- [10] M. NAKAMURA, Application of annatto colors, II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos e I Simpósio Internacional de Urucum. 1991, Campinas. Anais. Campinas: ITAL, (1991) 217-224.
- [11] C.R. Silva, L.M. Antunes, M.L. Bianchi, Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats, *Pharmacological research*, 43 (2001) 561-566.
- [12] M.K. Reddy, R.L. Alexander-Lindo, M.G. Nair, Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (2005) 9268-9273.
- [13] J.D. Tibodeau, C.R. Isham, K.C. Bible, Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Antioxidants & redox signaling*, 13 (2010) 987-997.
- [14] M. Roehrs, C.G. Figueiredo, M.M. Zanchi, et al., G.V. Bochi, R.N. Moresco, A. Quatrin, et al., S. Somacal, L. Conte, T. Emanuelli, Bixin and Norbixin Have Opposite Effects on Glycemia, Lipidemia, and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *International Journal of Endocrinology*, 2014 (2014) 10.
- [15] S. Somacal, C.G. Figueiredo, A. Quatrin, A.R. Ruviaro, L. Conte, P.R. Augusti, M. Roehrs, I.T. Denardin, J. Kasten, M.L. da Veiga, M.M. Duarte, T. Emanuelli, The

antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects, *Molecular and cellular biochemistry*, 403 (2015) 243-253.

[16] R.M. Perez Gutierrez, R. Valadez Romero, Effects of bixin in high-fat diet-fed-induced fatty liver in C57BL/6J mice, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (2016) 1015-1021.

[17] A. Anantharaman, H. Hemachandran, R.R. Priya, M. Sankari, M. Gopalakrishnan, N. Palanisami, R. Siva, Inhibitory effect of apocarotenoids on the activity of tyrosinase: Multi-spectroscopic and docking studies, *Journal of bioscience and bioengineering*, 121 (2016) 13-20.

[18] A.D. Pinzon-Garcia, P. Cassini-Vieira, C.C. Ribeiro, C.E. de Matos Jensen, L.S. Barcelos, M.E. Cortes, R.D. Sinisterra, Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, (2016).

[19] P.C. Stringueta, A.J. Reis, EXTRATO VEGETAL PROMOTOR DE CICATRIZAÇÃO DE EPIDERME E DAS MUCOSAS PARA USO TÓPICO E POR VIA ORAL, in: I.d.r.I.-I.N.d.P. Industrial (Ed.)Brasil, 2010.

[20] G.G. Graham, J. Punt, M. Arora, R.O. Day, M.P. Doogue, J.K. Duong, T.J. Furlong, J.R. Greenfield, L.C. Greenup, C.M. Kirkpatrick, J.E. Ray, P. Timmins, K.M. Williams, Clinical pharmacokinetics of metformin, *Clinical pharmacokinetics*, 50 (2011) 81-98.

[21] B. Viollet, B. Guigas, N. Sanz Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, F. Andreelli, Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview, *Clinical Science (London, England : 1979)*, 122 (2012) 253-270.

[22] E.M.R. Neto, L.A.R.V. Marques, P.L.D. Lobo, E. Moraes, Metformina: Uma Revisão da Literatura, *Revista Saúde e Pesquisa*, 8 (2015) 355-362.

[23] C.D. Nicoletti, A.P.Z. Frasson, FORMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Revisão Bibliográfica e Avaliação Comparativa da Qualidade de Comprimidos Retard de Nifedipina 20mg de Referência e Similar, *Revista Contexto & Saúde*, 5 (2006) 65-74.

[24] A. Bizerra, V. Silva, SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações, *Revista Saúde e Meio Ambiente*, 3 (2016) 1-12.

[25] C.M. Batista, C.M.B.d. Carvalho, N.S.S. Magalhães, Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43 (2007) 167-179.

[26] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerjee, Drug delivery systems: An updated review, *International journal of pharmaceutical investigation*, 2 (2012) 2-11.

[27] B. Rossi-Bergmann, A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico, *Ciência e Cultura*, 60 (2008) 54-57.

[28] J.C.O. Villanova, R.L. Oréfice, A.S. Cunha, Aplicações farmacêuticas de polímeros, *Polímeros*, 20 (2010) 51-64.

[29] P. Sabbatini, C. Aghajanian, D. Dizon, S. Anderson, J. Dupont, J.V. Brown, W.A. Peters, A. Jacobs, A. Mehdi, S. Rivkin, A.J. Eisenfeld, D. Spriggs, Phase II study of

CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22 (2004) 4523-4531.

[30] T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 74 (2001) 295-302.

[31] E. Rosenthal, I. Poizot-Martin, T. Saint-Marc, J.P. Spano, P. Cacoub, Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma, *American journal of clinical oncology*, 25 (2002) 57-59.

[32] W. Wu, S. Wieckowski, G. Pastorin, M. Benincasa, C. Klumpp, J.P. Briand, R. Gennaro, M. Prato, A. Bianco, Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 44 (2005) 6358-6362.

[33] X. Chen, J. Chen, B. Li, X. Yang, R. Zeng, Y. Liu, T. Li, R.J. Ho, J. Shao, PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles as oral drug delivery system: In vitro drug release and in vivo pharmacokinetics assessment, *Journal of colloid and interface science*, 490 (2017) 542-552.

[34] K.S. Kang, S.I. Lee, J.M. Hong, J.W. Lee, H.Y. Cho, J.H. Son, S.H. Paek, D.W. Cho, Hybrid scaffold composed of hydrogel/3D-framework and its application as a dopamine delivery system, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 175 (2014) 10-16.

[35] B. Patel, J. Rashid, N. Gupta, F. Ahsan, Low-Molecular-Weight Heparin-Coated and Montelukast-Filled Inhalable Particles: A Dual-Drug Delivery System for Combination Therapy in Asthma, *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

[36] E. Gong, B. Matthews, T. McCarthy, J. Chu, G. Holan, J. Raff, S. Sacks, Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses, *Antiviral research*, 68 (2005) 139-146.

[37] D.I. Bernstein, L.R. Stanberry, S. Sacks, N.K. Ayisi, Y.H. Gong, J. Ireland, R.J. Mumper, G. Holan, B. Matthews, T. McCarthy, N. Bourne, Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (2003) 3784-3788.

[38] Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, Sample preparation, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 191-219.

[39] R.E. Majors, *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*, (2014).

[40] K.B. BORGES, E.C. DE FIGUEIREDO, M.E.C. QUEIROZ, PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANALISE DE COMPOSTOS ORGANICOS, LTC2015.

[41] L. Novakova, H. Vlckova, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, *Analytica chimica acta*, 656 (2009) 8-35.

[42] C. Polson, P. Sarkar, B. Incedon, V. Raguvaran, R. Grant, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 785 (2003) 263-275.

- [43] D. Rajalingam, C. Loftis, J.J. Xu, T.K. Kumar, Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate, *Protein science : a publication of the Protein Society*, 18 (2009) 980-993.
- [44] A.L. Lehninger, M.M. Cox, *Principios de bioquímica*, Omega2006.
- [45] T.A. Wani, S. Zargar, New ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of irbesartan in human plasma, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23 (2015) 569-576.
- [46] C. Ji, J. Walton, Y. Su, M. Tella, Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS, *Analytica chimica acta*, 670 (2010) 84-91.
- [47] W. Zeng, Y. Xu, M. Constanzer, E.J. Woolf, Determination of sitagliptinin human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 878 (2010) 1817-1823.
- [48] Y. Deng, L. Musib, E. Choo, M. Chapple, S. Burke, J. Johnson, S. Eppler, B. Dean, Determination of cobimetinib in human plasma using protein precipitation extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 972 (2014) 117-123.
- [49] J. Wang, S. Kong, J. Yan, G. Jin, Z. Guo, A. Shen, J. Xu, X. Zhang, L. Zou, X. Liang, Hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction directly combined with protein precipitation for the determination of triptorelin in plasma, *Journal of Chromatography B*, 960 (2014) 214-221.
- [50] Y. Zhou, J. Jiang, P. Hu, H. Wang, A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method coupled with protein precipitation for determination of granisetron in human plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study, *Biomedical chromatography : BMC*, 28 (2014) 1597-1600.
- [51] J. Li, L. Wang, Z. Chen, R. Xie, Y. Li, T. Hang, G. Fan, Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of cefdinir in beagle dog plasma integrated with an automatic on-line solid-phase extraction following protein precipitation in the 96-well plate format, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 895-896 (2012) 83-88.
- [52] A. Alshishani, A. Makahleh, H.F. Yap, E.A. Gubartallah, S.M. Salhimi, B. Saad, Ion-pair vortex assisted liquid-liquid microextraction with back extraction coupled with high performance liquid chromatography-UV for the determination of metformin in plasma, *Talanta*, 161 (2016) 398-404.
- [53] S. Magiera, E. Kwietniowska, Fast, simple and efficient salting-out assisted liquid-liquid extraction of naringenin from fruit juice samples prior to their enantioselective determination by liquid chromatography, *Food Chem*, 211 (2016) 227-234.
- [54] S. Ahmed, A.M. Mahmoud, A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC- fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma, *Talanta*, 144 (2015) 480-487.

- [55] Chapter 9 Liquid-liquid extraction: Strategies for method development and optimization, in: A.W. David (Ed.) *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier 2003, pp. 307-326.
- [56] E.F.E.K. Kareem M. Younes, New validated bio-analytical HPLC method for the quantification of Clindamycin in human plasma, *International Journal of Analytical and Bioanalytical chemistry*, 3 (2013) 151–159.
- [57] L. W. Levy, E. Regalado, S. Navarrete, R. H. Watkins, Bixin and Norbixin in Human Plasma: Determination and Study of the Absorption of a Single Dose of Annatto Food Color, *Analyst*, 122 (1997) 977-980.
- [58] L. Sun, S. Forni, M.S. Schwartz, S. Breidinger, E.J. Woolf, Quantitative determination of odanacatib in human plasma using liquid-liquid extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 885-886 (2012) 15-23.
- [59] S.A. Breidinger, R.C. Simpson, E. Mangin, E.J. Woolf, Determination of suvorexant in human plasma using 96-well liquid-liquid extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B*, 1002 (2015) 254-259.
- [60] S. Liu, P.K. Dasgupta, Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2042-2049.
- [61] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal Chem*, 68 (1996) 2236-2240.
- [62] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Anal Chem*, 68 (1996) 1817-1821.
- [63] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Single drop microextraction--development, applications and future trends, *Journal of chromatography. A*, 1217 (2010) 2326-2336.
- [64] W. Gao, G. Chen, Y. Chen, N. Li, T. Chen, Z. Hu, Selective extraction of alkaloids in human urine by on-line single drop microextraction coupled with sweeping micellar electrokinetic chromatography, *Journal of chromatography. A*, 1218 (2011) 5712-5717.
- [65] W. Gao, Y. Chen, G. Chen, J. Xi, Y. Chen, J. Yang, N. Xu, Trace analysis of three antihistamines in human urine by on-line single drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled to sweeping micellar electrokinetic chromatography and its application to pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B*, 904 (2012) 121-127.
- [66] A. Sarafraz Yazdi, N. Razavi, Separation and Determination of Amitriptyline and Nortriptyline in Biological Samples Using Single-Drop Microextraction with GC, *Chromatographia*, 73 (2011) 549-557.
- [67] E.M. Gioti, D.C. Skalkos, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1093 (2005) 1-10.
- [68] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.

- [69] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 1-14.
- [70] P. Fernández, M. Regenjo, A.M. Bermejo, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *Journal of Applied Toxicology*, 35 (2015) 418-425.
- [71] A. Bulatov, K. Medinskaia, D. Aseeva, S. Garmonov, L. Moskvin, Determination of antipyrine in saliva using the dispersive liquid-liquid microextraction based on a stepwise injection system, *Talanta*, 133 (2015) 66-70.
- [72] T. Ahmadi-Jouibari, N. Fattahi, M. Shamsipur, M. Pirsaeheb, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85 (2013) 14-20.
- [73] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 71 (1999) 2650-2656.
- [74] J. Merib, E. Carasek, Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes, *Scientia Chromatographica*, 5 (2013) 249-262.
- [75] S. Ncube, A. Poliwoda, H. Tutu, P. Wiczorek, L. Chimuka, 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*, 1033-1034 (2016) 372-381.
- [76] K.M. Cooper, N. Jankhaikhot, G. Cuskelly, Optimised extraction of heterocyclic aromatic amines from blood using hollow fibre membrane liquid-phase microextraction and triple quadrupole mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1358 (2014) 20-28.
- [77] F.M. Lanças, Extração em fase sólida (SPE), *RiMa2004*.
- [78] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80 (2016) 641-654.
- [79] C.C. Ribeiro, R.M. Orlando, J.J.R. Rohwedder, F.G.R. Reyes, S. Rath, Electric field-assisted solid phase extraction and cleanup of ionic compounds in complex food matrices: Fluoroquinolones in eggs, *Talanta*, 152 (2016) 498-503.
- [80] J. Rossmann, S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel, W. Kirch, Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 969 (2014) 162-170.
- [81] A. Gajda, A. Posyniak, J. Zmudzki, G. Tomczyk, Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 928 (2013) 113-120.

- [82] S.L. Dalmora, L. Brum Junior, R.M. Ferretto, P.R.d. Oliveira, T. Barth, M.d.S. Sangoi, Determination of etoricoxib in human plasma using automated on-line solid-phase extraction coupled with LC-APCI/MS/MS, *Química Nova*, 31 (2008) 574-578.
- [83] S.W. Su, Y.C. Liao, C.W. Whang, Analysis of alendronate in human urine and plasma by magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis with fluorescence detection, *Journal of separation science*, 35 (2012) 681-687.
- [84] S. Napoletano, C. Montesano, D. Compagnone, R. Curini, G. D'ascenzo, C. Roccia, M. Sergi, Determination of Illicit Drugs in Urine and Plasma by Micro-SPE Followed by HPLC-MS/MS, *Chromatographia*, 75 (2012) 55-63.
- [85] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *Journal of chromatography*, 475 (1989) 353-361.
- [86] P. Arnnok, N. Patdhanagul, R. Burakham, Dispersive solid-phase extraction using polyaniline-modified zeolite NaY as a new sorbent for multiresidue analysis of pesticides in food and environmental samples, *Talanta*, 164 (2017) 651-661.
- [87] Q.-H. Zou, Y. Liu, M.-X. Xie, J. Han, L. Zhang, A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica chimica acta*, 551 (2005) 184-191.
- [88] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 2145-2148.
- [89] F.M. Musteata, J. Pawliszyn, Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction, *J Pharm Biomed Anal*, 37 (2005) 1015-1024.
- [90] S. Gentili, C. Mortali, L. Mastrobattista, P. Berretta, S. Zaami, Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers, *J Pharm Biomed Anal*, 129 (2016) 282-287.
- [91] D.E. Breithaupt, Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction, *Food Chemistry*, 86 (2004) 449-456.
- [92] L. Discenza, C. D'Arienzo, T. Olah, M. Jemal, LC-MS/MS method using unbonded silica column and aqueous/methanol mobile phase for the simultaneous quantification of a drug candidate and co-administered metformin in rat plasma, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 878 (2010) 1583-1589.
- [93] V. Porta, S.G. Schramm, E.K. Kano, E.E. Koono, Y.P. Armando, K. Fukuda, C.H.d.R. Serra, HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 143-147.
- [94] S.R. Polagani, N.R. Pilli, R. Gajula, V. Gandu, Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3 (2013) 9-19.
- [95] R. Pontarolo, A.C. Gimenez, T.M.G. de Francisco, R.P. Ribeiro, F.L.D. Pontes, J.C. Gasparetto, Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human

plasma by a HILIC–MS/MS method, *Journal of Chromatography B*, 965 (2014) 133-141.

[96] S.L. Montoya-Eguía, L. Garza-Ocañas, C.T. Badillo-Castañeda, E. Tamez-de la O, T. Zanatta-Calderón, M.V. Gómez-Meza, H. Garza-Ulloa, Comparative Pharmacokinetic Study Among 3 Metformin Formulations in Healthy Mexican Volunteers: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, 3-Period Crossover Study, *Current Therapeutic Research*, 77 (2015) 18-23.

[97] M.V. Attimarad, A.B. Nair, B.E. Aldhubaib, Development of liquid chromatographic method for the simultaneous determination of metformin and miglitol in human plasma: application to pharmacokinetic studies, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 12 (2015) 1629-1636.

[98] C. Yardimci, N. Ozaltin, A. Gurlek, Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection, *Talanta*, 72 (2007) 1416-1422.

[99] F. Sherif, A.H. Mohamed, M.A.-A. Lobna, S. Ismail, Development and Validation of a UPLC–MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Telmisartan and Metformine HCl in Human Plasma, *Current Analytical Chemistry*, 11 (2015) 130-137.

[100] L. Chen, Z. Zhou, M. Shen, A. Ma, Simultaneous determination and pharmacokinetic study of metformin and rosiglitazone in human plasma by HPLC-ESI-MS, *Journal of chromatographic science*, 49 (2011) 94-100.

[101] S. Mowaka, E.F. Elkady, M.M. Elmazar, B.M. Ayoub, Enhanced LC-MS/MS determination of alogliptin and metformin in plasma: Application to a pharmacokinetic study, *Microchemical Journal*, 130 (2017) 360-365.

[102] P.K. Porwal, G.S. Talele, Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glibenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, (2016).

[103] H.P. Chhetri, P. Thapa, A. Van Schepdael, Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22 (2014) 483-487.

[104] S. AbuRuz, J. Millership, J. McElnay, The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimiperide in plasma, *Journal of Chromatography B*, 817 (2005) 277-286.

[105] A.L. van Nuijs, I. Tarcomnicu, W. Simons, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398 (2010) 2211-2222.

[106] X. Wu, B. Zhu, L. Lu, W. Huang, D. Pang, Optimization of a solid phase extraction and hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of metformin in dietary supplements and herbal medicines, *Food Chem*, 133 (2012) 482-488.

- [107] P.A. Shah, J.V. Shah, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of metformin and sitagliptin in human plasma after ion-pair solid phase extraction, *J Pharm Biomed Anal*, 131 (2016) 64-70.
- [108] N. Koseki, H. Kawashita, M. Niina, Y. Nagee, N. Masuda, Development and validation for high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal-phase LC/MS/MS, *J Pharm Biomed Anal*, 36 (2005) 1063-1072.
- [109] G.M. Ben-Hander, A. Makahleh, B. Saad, M.I. Saleh, K.W. Cheng, Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids, *Talanta*, 131 (2015) 590-596.
- [110] F. Tache, V. David, A. Farca, A. Medvedovici, HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system, *Microchemical Journal*, 68 (2001) 13-19.
- [111] C.H. Collins, I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia, *Scientia Chromatographica*, 1 (2009) 7-20.
- [112] C.H. Collins, G. Braga, P.S. Bonato, *Fundamentos de cromatografia*, Editorada Unicamp 2006.
- [113] L. Maldaner, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, *Química Nova*, 33 (2010) 1559-1568.
- [114] L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, *Química Nova*, 32 (2009) 214-222.
- [115] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, M.T. Grassi, *Fundamentos de química analítica*, Pioneira Thomson Learning 2006.
- [116] M.E. Swartz, B.J. Murphy, Ultra performance liquid chromatography: tomorrow's HPLC technology today, *LabPlus International*, 18 (2004) 6-9.
- [117] M.E. Swartz, B.J. Murphy, *New frontiers in chromatography*, American Laboratory, (2005).
- [118] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of separation science*, 29 (2006) 1836-1848.
- [119] L. Brum Junior, M.G. Leal, F. de Toni Uchoa, M. Kaiser, S.S. Guterres, T. Dalla Costa, Determination of Quinine and Doxycycline in Rat Plasma by LC-MS-MS: Application to a Pharmacokinetic Study, *Chromatographia*, 73 (2011) 1081-1088.
- [120] D. Moreno-González, A.M. García-Campaña, Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods, *Food Chemistry*, 221 (2017) 1763-1769.
- [121] Z.P. Wang, J.Z. Shen, R.J. Linhardt, H. Jiang, L.L. Cheng, Liquid to liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of hainanmycin in feed, *Journal of Chromatography B*, 1046 (2017) 98-101.
- [122] D. Pensi, A. De Nicolo, M. Pinon, P.L. Calvo, A. Nonnato, A. Brunati, G. Di Perri, A. D'Avolio, An UPLC-MS/MS method coupled with automated on-line SPE for

quantification of tacrolimus in peripheral blood mononuclear cells, *J Pharm Biomed Anal*, 107 (2015) 512-517.

[123] M. Scherf-Clavel, P. Hogger, Analysis of metformin, sitagliptin and creatinine in human dried blood spots, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 997 (2015) 218-228.

[124] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley 2013.

[125] J.G. Swales, R.T. Gallagher, M. Denn, R.M. Peter, Simultaneous quantitation of metformin and sitagliptin from mouse and human dried blood spots using laser diode thermal desorption tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 55 (2011) 544-551.

[126] X. Chen, Q. Gu, F. Qiu, D. Zhong, Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method, *Journal of Chromatography B*, 802 (2004) 377-381.

[127] *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, in: F.a.D.A.-. FDA (Ed.), 2013.

[128] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, 27 (2004) 771-780.

[129] R.C. Chiste, F. Yamashita, F.C. Gozzo, A.Z. Mercadante, Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds, *Journal of chromatography. A*, 1218 (2011) 57-63.

[130] V.A. Marcolino, G.M. Zanin, L.R. Durrant, T. Benassi Mde, G. Matioli, Interaction of curcumin and bixin with beta-cyclodextrin: complexation methods, stability, and applications in food, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (2011) 3348-3357.

[131] J. Rehbein, B. Dietrich, M.D. Grynbaum, P. Hentschel, K. Holtin, M. Kuehnle, P. Schuler, M. Bayer, K. Albert, Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR, *Journal of separation science*, 30 (2007) 2382-2390.

[132] A.O. Rios, A.Z. Mercadante, OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA OBTENÇÃO DE PADRÃO DE BIXINA E DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E SAPONIFICAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIXINA EM “SNACKS” EXTRUSADOS POR CLAE, *Alimentos e Nutrição*, 15 (2004) 203-213.

[133] M. Petro, D. Berek, Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography, *Chromatographia*, 37 (1993) 549-561.

[134] L.S. New, E.C. Chan, Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) column chemistries for the UPLC-MS-MS analysis of glutathione, glutathione disulfide, and ophthalmic acid in mouse liver and human plasma, *Journal of chromatographic science*, 46 (2008) 209-214.

[135] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley 2011.

[136] S. Ulrich, Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 167-194.

## 7. Anexo I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 318 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do efeito de compostos de inclusão/associação e nanodispositivos poliméricos (nanopartículas) contendo substâncias antioxidantes e”, que tem como responsável Rubén Dario Sinisterra Millán, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/11/2015. Este certificado espira-se em 10/11/2020.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 318 / 2015, related to the Project entitled “Effect of inclusion/association complex and nanodevices (nanoparticles) with antioxidant and hypoglycemic activity”, under the supervision of Rubén Dario Sinisterra Millán, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/11/2015. This certificates expires in 10/11/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 10/11/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 [www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 322 / 2015, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NANOFIBRAS POLIMERICAS DE PCL CONTENDO DIFERENTES AGENTES, SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS”, que tem como responsável Rubén Dario Sinisterra Millán, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/11/2015. Este certificado espira-se em 24/11/2020.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 322 / 2015, related to the Project entitled “NANOFIBER EFFECT ASSESSMENT OF POLYMERIC PCL CONTAINING BIXIN, ON WOUND HEALING IN DIABETIC MICE”, under the supervision of Rubén Dario Sinisterra Millán, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/11/2015. This certificates expires in 24/11/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 24/11/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 [www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)