

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA VELOSO FERREIRA

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFONILUREIAS EM PLASMA
HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA
EFICIÊNCIA COM COLUNA DE MEIO DE ACESSO RESTRITO E COLUNA
COM PARTÍCULAS DE NÚCLEO FUNDIDO**

Belo Horizonte – MG

2015

JULIANA VELOSO FERREIRA

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFONILUREIAS EM PLASMA
HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO COM COLUNA
DE MEIO DE ACESSO RESTRITO E COLUNA COM PARTÍCULAS DE
NÚCLEO FUNDIDO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Belo Horizonte – MG

2015

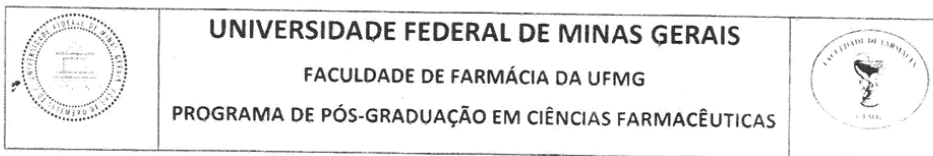
F383d Ferreira, Juliana Veloso.
Determinação simultânea de sulfonilureias em plasma humano empregando cromatografia a líquido com coluna de meio de acesso restrito e coluna com partículas de núcleo fundido / Juliana Veloso Ferreira. – 2015.
125 f. : il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.
Coorientador: Christian Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Diabetes – Tratamento – Teses. 2. Diabetes mellitus – Teses.
3. Sulfonilureia – Teses. 4. Insulina – Teses. 5. Plasma humano – Teses.
6. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. Fernandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI. Título.

CDD: 616.642




FOLHA DE APROVAÇÃO


“Determinação simultânea de sulfonilureias em plasma humano empregando cromatografia a líquido de alta eficiência com coluna de meio de acesso restrito e coluna com partículas de núcleo fundido.”

JULIANA VELOSO FERREIRA

DISSERTAÇÃO submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de MESTRA em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISSERTAÇÃO apresentada em sessão pública e aprovada em 29 de junho de 2015, pela Comissão constituída pelos seguintes membros:


GERSON ANTÔNIO PIANETTI (Orientador)
Professor Doutor - UFMG


CHRISTIAN FERNANDES (Coorientador)
Professor Doutor - UFMG


LEONARDO DE SOUZA TEIXEIRA
Professor Doutor - ICF


ISABELA DA COSTA CÉSAR
Professora Doutora - UFMG

Dedico o título de mestre

Aos meus pais, Edson e Patrícia, e ao meu Irmão, Fabiano, que mesmo distantes sempre acreditaram em mim e me ajudaram a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti por me receber como sua aluna, pela sua orientação e empenho em fornecer todas as condições necessárias para realização deste trabalho. E, principalmente, por todos os ensinamentos que contribuem para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Christian Fernandes pela confiança depositada em mim. Pela coorientação, dedicação e paciência, além da colaboração técnica e prática que ajudaram no enriquecimento e desenvolvimento desse trabalho.

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela ajuda e pela cordialidade com que sempre me receberam.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro.

Aos professores da Faculdade de Farmácia, em especial à Profa. Dra., Isabela da Costa César e à Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares pela contribuição para o meu amadurecimento acadêmico.

A todos os amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e do CEDAFAR, em especial, Ana, Diego, Grazi, Ju, Mateus, Naialy, Paula e Pedro pelas trocas de conhecimentos, dicas e principalmente pela ajuda. Pela amizade construída, tão importante nesse momento, tornando tudo mais fácil e prazeroso.

À Iara e ao Vinícius que, mesmo estando distantes, contribuíram e me ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e que, de algum modo, contribuíram direta ou indiretamente, na torcida constante e sempre acreditando em mim. Em especial: à Camila pela amizade, participando em todos os momentos bons e ruins; ao Rodrigo pelos momentos juntos e por todo carinho que meu deu; e à minha tia Valéria por sempre me acolher com muito amor e cuidado.

Aos meus pais, Edson e Patrícia, e ao meu irmão, Fabiano, pelo apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui, sempre confiando e acreditando em mim. Pelo amor, dedicação e apoio sempre.

À todos que me ajudaram de alguma maneira na realização desta etapa. Meus sinceros agradecimentos.

Se vos causamos enfado por sermos sombras, azado plano sugiro: é pensar que estivestes a sonhar; foi tudo mera visão no correr desta sessão. Senhoras e cavalheiros, não vos mostreis zombeteiros; se me quiserdes perdoar, melhor coisa hei de vos dar. Puck eu sou, honesto e bravo; se eu puder fugir do agravo da língua má da serpente, vereis que Puck não mente. Liberto assim, dos apodos, eu digo boa noite a todos. Se a mão me derdes, agora, vai Robim, alegre, embora.

(William Shakespeare, Sonho de Uma Noite de Verão)

RESUMO

O *diabetes mellitus* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na população, sendo a classe das sulfonilureias amplamente utilizadas no seu tratamento. Atualmente, sua determinação em matrizes biológicas é realizada por meio de técnicas de preparo de amostras convencionais, o que frequentemente leva ao aumento do tempo total da análise e dos erros analíticos. Essas limitações podem ser reduzidas com o uso de colunas com meio de acesso restrito (RAM), que possibilitam a injeção direta de fluidos biológicos nos sistemas cromatográficos. Ademais, o uso de colunas de núcleo fundido, que permitem o emprego de altas vazões de fase móvel (FM), leva à redução do tempo total da análise. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de método bioanalítico para a determinação simultânea de três fármacos da classe das sulfonilureias: glibenclamida, gliclazida e glimepirida, em plasma humano, empregando cromatografia a líquido de alta eficiência bidimensional (*column switching* automatizado) em modo de eluição *backflush*, com coluna RAM, como fase de exclusão, acoplada à coluna com partículas de núcleo fundido. A média das porcentagens de exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM foi de 104,5%. As condições do método desenvolvido, para a primeira dimensão, foram: coluna RAM-ADS, FM constituída de água ultrapura pH 6,0, com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e tempo de viragem de válvula de 3 minutos. Na segunda dimensão foi empregada pré-coluna C18 acoplada a coluna analítica contendo partículas de núcleo fundido C18, FM constituída de acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), com vazão de 0,8 mL min⁻¹. O tempo de eluição dos analitos foi de 1 minuto, a temperatura de 35°C, o volume de injeção de 200 µL e o comprimento de onda de detecção de 230 nm. Foi empregado ácido flufenâmico como padrão interno. O tempo total da análise, englobando o tempo referente à etapa cromatográfica (8 minutos) e o tempo dedicado à extração (3 minutos para exclusão proteica e 1 minuto para eluição dos analitos), foi de apenas 12 minutos.

Palavras-chave: preparo de amostras – meio de acesso restrito – *column switching* – plasma humano – sulfonilureias – partículas de núcleo fundido.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the main causes of morbidity and mortality in the population and the sulfonylureas are widely used in the treatment. Currently, its determination in biological matrices is performed by conventional sample treatment techniques, which often leads to an increase of the total time of analysis and analytical errors. These limitations can be reduced by using columns with restricted access media (RAM), which allow the direct injection of biological fluids in chromatographic systems. Furthermore, the use of fused-core particles columns, allowing the use of high mobile phase (MP) flow rates, lead to a reduced total analysis time. Given the above, this study aimed to develop a bioanalytical method for the simultaneous determination of three drugs of the sulfonylurea class: glibenclamide, gliclazide and glimepiride in human plasma, using a two-dimensional high performance liquid chromatography (column switching automated) in backflush elution mode, with RAM column, as exclusion phase, coupled with a fused-core particle column. The average plasma protein exclusion percentages of the RAM column was 104.5%. The conditions of the method developed, for the first dimension, were: RAM-ADS column, MP consisting of ultrapure water pH 6.0, at 1.0 mL min⁻¹ flow rate and 3 minute turning valve time. In the second dimension was employed a guard column (C18) coupled with a fused-core particle column (C18), MP consisting of acetonitrile and 10 mM phosphate buffer pH 3.0 (54:46 v/v) with a 0.8 mL min⁻¹. The elution time of the analytes was 1 minute, temperature was set at 35°C, injection volume set as 200 µL and wavelength detection was set as 230 nm. Flufenamic acid was used as internal standard. The total time of analysis, including the time related to the chromatographic step (8 minutes) and the time devoted to the extraction (3 minutes for protein exclusion and 1 minute for the analytes elution) was only 12 minutes.

Keywords: sample treatment – restricted access media – column switching – human plasma – sulfonylureas – fused-core particles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem de tempo gasto em cada etapa do desenvolvimento bioanalítico (MAJORS, 1991)	23
Figura 2 – Porcentagem dos erros gerados em cada etapa do desenvolvimento bioanalítico (MAJORS, 1991)	24
Figura 3 – Esquematização da técnica SPME. Adaptado de Valente, 2000	30
Figura 4 – Esquematização da técnica MEPS. Adaptado de Abdel-Rehim, 2004	32
Figura 5 – Estrutura da partícula de meio de acesso restrito. Adaptado de SADILEK, 2007	36
Figura 6 – Representação esquemática da fase hidrofóbica com proteína imobilizada. Adaptado de Souverain, 2004	38
Figura 7 – Representação esquemática da fase ISRP. Adaptado de Souverain, 2004	39
Figura 8 – Representação esquemática da fase SHP. Adaptado de Souverain, 2004	40
Figura 9 – Representação esquemática da fase MFP. Adaptado de Souverain, 2004	41
Figura 10 – Representação esquemática da fase SPS. Adaptado de Souverain, 2004	42
Figura 11 – Representação esquemática da fase ADS. Adaptado de Souverain, 2004	43
Figura 12 – Esquema da configuração do sistema <i>column-switching</i> no modo de eluição <i>backflush</i>	45
Figura 13 – Esquema da configuração do sistema <i>column-switching</i> no modo de eluição <i>foreflush</i>	46
Figura 14 – Representação esquemática de uma partícula de núcleo fundido. Adaptado de Maldaner, 2010	48
Figura 15 – Estruturas das sulfonilureias analisadas (GB, GM e GZ) com suas respectivas fórmulas moleculares e massas molares.....	52
Figura 16 – Número de trabalhos encontrados na literatura que tratam da determinação de sulfonilureias em plasma humano, classificados de acordo com a técnica de preparo de amostras utilizada	55
Figura 17 – Número de trabalhos encontrados na literatura que tratam da determinação de sulfonilureias em plasma humano, classificados de acordo com as sulfonilureias analisadas	57
Figura 18 – Esquema da montagem do sistema cromatográfico para avaliação da exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS	71
Figura 19 – Cromatogramas obtidos após eluição do plasma branco em sistema sem coluna e após exclusão em coluna RAM-ADS. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel: água ultrapura, vazão: 1,0 mLmin ⁻¹ . Comprimento de onda: 280 nm	76
Figura 20 – Espectros de absorção de soluções de GB, GM, GZ e ácido flufenâmico a 0,1 mg mL ⁻¹ em metanol	77
Figura 21 – Cromatogramas obtidos a partir da exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS. Volumes de injeção da amostra: 20, 50, 100, 200 e 500 µL. Fase móvel: água ultrapura, vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 280 nm	79

Figura 22 – Cromatogramas obtidos a partir da análise de plasma branco e fortificado, sem viragem de válvula. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	80
Figura 23 – Áreas sob os picos de GB, GM, GZ e PI em função do tempo de viragem de válvula da posição A para a posição B	81
Figura 24 – Áreas sob os picos de GB, GM, GZ e PI em função do pH da fase móvel de exclusão	82
Figura 25 – Cromatogramas de plasma branco obtidos após análise de plasma fortificado, em diferentes valores de pH da fase móvel de exclusão, para análise de efeito residual. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 4,0; 5,0; 6,0, vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	83
Figura 26 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica com vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	85
Figura 27 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica: gradiente A, vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	86
Figura 28 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica: gradiente B, vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	86
Figura 29 – Aumento das porcentagens de área e altura dos picos de GB, GM, GZ e PI em função do volume de plasma injetado	88
Figura 30 – Aumento da altura dos picos de GB, GM, GZ e PI em função do volume de plasma injetado	89
Figura 31 – Variação dos valores de área dos picos de GB, GM, GZ e PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado (µL)	90
Figura 32 – Variação dos valores de altura dos picos de GB, GM, GZ e PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado (µL)	91
Figura 33 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando PP como técnica de preparo de amostra. Volume de amostra injetado: 200 e 500 µL. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda: 230 nm	92

Figura 34 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando PP como técnica de preparo de amostra. Volume de amostra injetado: 200 e 500 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm	93
Figura 35 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando dois modos de eluição do sistema bidimensional: <i>backflush</i> e <i>foreflush</i> . Volume de amostra injetado: 200 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm	94
Figura 36 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de plasma branco utilizando o método otimizado em modo <i>backflush</i> . Volume de amostra injetado: 200 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm	96

LISTA DE TABELAS

1 Cronologia do desenvolvimento dos principais suportes RAM	35
2 Classificação das colunas RAM de acordo com as superfícies químicas dos seus sorventes	37
3 Fármacos antidiabéticos orais e seus mecanismos de ação	51
4 Trabalhos descritos na literatura que tratam do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa de sulfonilureias (GB, GM e GZ) em plasma humano, utilizando CLAE	58
5 Porcentagem de exclusão de proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS	76
6 Condições do gradiente A para a fase móvel analítica	84
7 Condições do gradiente B para a fase móvel analítica	84
8 Variação das porcentagens de aumento das áreas e alturas dos picos em função do volume de plasma injetado (μL)	88
9 Altura dos picos das sulfonilureias e do PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADS	<i>Alkil-diol sílica</i> (sílica alquil-diol)
AGP	<i>α_1-acid glycoprotein</i> (α_1 -glicoproteína ácida)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATE	Atenolol
ATO	Atorvastatina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CEDAFAR-BIO	Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico
CG	Cromatografia gasosa
CI	Cromatografia iônica
CL	Clorpropamida
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
$C_{m\acute{a}x}$	Concentração máxima
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
DAD	<i>Diode array detector</i> (detector de arranjo de diodos)
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-IV	Dipeptidil peptidase IV
DPR	Desvio padrão relativo
ECC	Estabilidade de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
ELD	Estabilidade de longa duração
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPP	Estabilidade de pós-processamento
EPR	Erro padrão relativo
ESS	Estabilidade do analito e PI em solução

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Fator de matriz normalizado
GB	Glibenclamida
GFF	Glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina
GM	Glimepirida
GP	Glipizida
GZ	Gliclazida
ISRP	<i>Internal surface reversed phase</i> (superfície interna de fase reversa)
LCQ	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos
LIQ	Limite de quantificação inferior
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
LSQ	Limite superior de quantificação
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i> (microextração por sorvente empacotado)
MET	Metformina
MFP	<i>Mixed-functional phase</i> (fase funcional mista)
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> (polímero molecularmente impresso)
MISPE	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction</i> (extração em fase sólida molecularmente impressa)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrômetro de massas)
NAP	Naproxeno sódico
PI	Padrão interno
PIO	Pioglitazona
PP	<i>Protein precipitation</i> (precipitação proteica)
RAM	<i>Restricted access media</i> (meio de acesso restrito)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rec	Recuperação
REP	Repaglinida
ROS	Rosiglitazona
ROV	Rosuvastatina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes

SFC	<i>Supercritical fluid chromatography</i> (cromatografia de flúido supercrítico)
SGLT ₂	<i>Sodium glucose cotransport type 2</i> (cotransportador sódio-glicose tipo 2)
SHP	<i>Shielded hydrophobic phase</i> (fase hidrofóbica blindada)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase sólida)
SPI	Espirolactona
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> (microextração em fase sólida)
SPS	<i>Semipermeable surface</i> (superfície semipermeável)
SQR	Substância química de referência
t _{máx}	Tempo máximo
TB	Tolbutamida
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultra-violeta
v/v	Volume por volume
XDS	<i>Exchange diol sílica</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Amostras biológica	22
2.2 Técnicas convencionais para preparo de amostras biológicas ..	25
2.2.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)	25
2.2.2 Precipitação Proteica (PP)	26
2.2.3 Extração em Fase Sólida (SPE) convencional	27
2.3 Técnicas modernas para preparo de amostras biológicas	28
2.3.1 Configurações para SPE modernas	29
2.3.1.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)	29
2.3.1.2 Microextração em Sorvente Empacotado (MEPS)	31
2.3.2 Sorventes para SPE modernas	33
2.3.2.1 Polímeros de Impressão Molecular (MIPs)	33
2.3.2.2 Meios de Acesso Restrito (RAM)	35
2.3.2.2.1 <i>Fase hidrofóbica com proteína imobilizada (protein-coated sílica)</i>	37
2.3.2.2.2 <i>Superfície interna de fase reversa (ISRP)</i>	38
2.3.2.2.3 <i>Fase hidrofóbica blindada (SHP)</i>	39
2.3.2.2.4 <i>Material funcional misto (MFP)</i>	40
2.3.2.2.5 <i>Superfície semipermeável (SSP)</i>	41
2.3.2.2.6 <i>Sílica alquil-diol (ADS)</i>	42
2.4 Cromatografia multidimensional	43
2.5 Coluna cromatográfica com partículas de núcleo fundido	47
2.6 Diabetes mellitus	49
2.7 Sulfonilureias	51
2.8 Determinação de sulfonilureias em plasma humano	54
2.9 Validação de métodos bioanalítico	66
3 OBJETIVOS	67
3.1 Objetivo geral	67
3.2 Objetivos específicos	67
4 MATERIAIS E MÉTODOS	68

4.1 Materiais	68
4.1.1 Insumos	68
4.1.2 Reagentes e vidrarias	68
4.1.3 Equipamentos e materiais	69
4.1.4 Amostras biológicas	70
4.2 Métodos	70
4.2.1 Preparo de soluções	70
4.2.2 Avaliação da eficiência de exclusão das proteínas do plasma humano pela coluna RAM-ADS	71
4.2.3 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas.....	71
4.2.3.1 Determinação do tempo necessário para exclusão proteica	72
4.2.3.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima no UV	72
4.2.3.3 Determinação do tempo necessário para eluição dos analitos	73
4.2.3.4 Determinação das fases móveis de exclusão e analítica	73
4.2.3.5 Determinação do volume de injeção	73
4.2.4 Precipitação proteica	74
4.2.5 Backflush x foreflush	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Eficiência de exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS	75
5.2 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas	77
5.2.1 Comprimento de onda de absorção máxima no UV	77
5.2.2 Escolha do padrão interno	78
5.2.3 Tempo necessário para exclusão proteica	78
5.2.4 Tempo necessário para eluição dos analitos da coluna RAM-ADS	79
5.2.5 Fase móvel de exclusão	81
5.2.6 Fase móvel analítica	83
5.2.7 Volume de injeção	87
5.3 Precipitação proteica	89
5.4 Backflush x foreflush	93

5.5 Condições cromatográficas desenvolvidas	95
6 CONCLUSÃO	98
7 PRÓXIMAS ETAPAS	99
7.1 Protocolo de validação do método bioanalítico	99
7.1.1 Amostras biológicas	99
7.1.2 Condições cromatográficas	100
7.1.3 Parâmetros de validação do método bioanalítico	100
7.1.3.1 Seletividade	100
7.1.3.2 Efeito residual	101
7.1.3.3 Recuperação	102
7.1.3.4 Curva de calibração	103
7.1.3.5 Precisão e exatidão	104
7.1.3.6 Estabilidade dos analitos em matriz biológica	105
7.1.3.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	106
7.1.3.6.2 Estabilidade de curta duração	107
7.1.3.6.3 Estabilidade de longa duração	107
7.1.3.7. Estabilidade do analito e PI em solução	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO A – Certificados de participação no Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins – SIMCRO, 2014	122
ANEXO B – Certificados de participação no Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR, 2014	124

1 INTRODUÇÃO

A análise de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas, é um procedimento comum para diagnóstico clínico, análises toxicológicas e na pesquisa farmacêutica. Dentre os problemas recorrentes nesse tipo de análise, podem ser citadas as baixas concentrações dos analitos nestas matrizes e a interferência causada pela presença de outros compostos, como as proteínas plasmáticas, além da ligação dos analitos à essas proteínas (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; CASSIANO *et al.*, 2006).

Para a análise de matrizes biológicas por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é necessário um pré-tratamento antes da sua injeção no sistema, de maneira a concentrar o analito e eliminar as proteínas presentes na amostra. Essas proteínas podem sofrer adsorção irreversível à fase estacionária da coluna analítica, resultando na diminuição de sua vida útil e no aumento da pressão do sistema. Sendo assim, o preparo da amostra é uma etapa crítica e limitante para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos em fluidos biológicos por CLAE (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; MULLET, 2007; SADÍLEK *et al.*, 2007; SOUVERAIN *et al.*, 2004).

As técnicas empregadas para o preparo de amostras podem ser divididas em convencionais e modernas, sendo que estas últimas foram desenvolvidas com o intuito de diminuir o tempo de análise, o gasto de solvente orgânico e a exposição do analista, problemas frequentemente relacionados às técnicas convencionais. Dentre as técnicas modernas, pode ser citada a extração em fase sólida *online* empregando colunas com meio de acesso restrito (RAM, do inglês *restricted access media*). Esse tipo de suporte permite a injeção direta de amostras biológicas em sistemas cromatográficos, por possuir mecanismos de exclusão de macromoléculas, restringindo seu acesso aos sítios de adsorção do suporte (CHEN *et al.*, 2008; DESILETS *et al.*, 1991).

A injeção direta do material biológico no sistema cromatográfico, modo *online*, permite uma redução do manuseio do material pelo analista, trazendo vantagens como sua menor exposição à amostra biológica e a compostos tóxicos, menor exposição da amostra a oxidação e evaporação, além da diminuição dos erros durante a análise. Esse modo automatizado empregando coluna RAM pode ser

realizado em um sistema cromatográfico bidimensional, com a fase extratora na primeira dimensão e a fase analítica na segunda dimensão (BAKHTIAR e MAJUMDAR, 2007; MULLET, 2007; KRISHNAM e IBRAHAM, 1994; LIMA *et al.*, 2006).

O *diabetes mellitus* (DM) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na população, estimando-se que cerca de 382 milhões de pessoas no mundo estão acometidas pela enfermidade, sendo que, no Brasil, a ocorrência média de diabetes na população adulta é de 5,2% (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015; American Diabetes Association, 2015; RAMALHO, 2006, World Health Organization, 2015, Portal da Saúde, 2015).

O DM pode ser classificado em tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). O DM1 é uma doença autoimune em que há um distúrbio catabólico levando a ausência de insulina, sendo necessária a aplicação de insulina exógena como tratamento. Já o DM2 é uma patologia heterogênea que abrange várias formas de diabetes, sendo que todas têm em comum a insuficiência de insulina ou sua insensibilidade nos tecidos. É frequentemente associada à idade, hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias e outras afecções cardiovasculares. Seu tratamento envolve a mudança do estilo de vida, manutenção do peso ideal e o uso de agentes antidiabéticos orais, dentre eles as sulfonilureias (RAMALHO, 2006; MOREAU e SIQUEIRA, 2008).

Atualmente, a determinação de sulfonilureias em fluidos biológicos é realizada por meio de técnicas de preparo de amostras convencionais para posterior separação cromatográfica. Estas técnicas apresentam inúmeras desvantagens como, principalmente, o aumento dos erros analíticos e do tempo total de análise. Diante do exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de método bioanalítico simples e rápido para a determinação simultânea das sulfonilureias glibenclamida (GB), glimepirida (GM) e gliclazida (GZ), em plasma humano utilizando um sistema CLAE bidimensional composto por uma coluna RAM na etapa de preparo de amostras e por uma coluna analítica contendo partículas de núcleo fundido na etapa de separação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Amostras biológicas

A análise de fármacos e seus metabólitos em fluidos biológicos é essencial na química clínica, na área de controle de doping, na toxicologia e na pesquisa farmacêutica (farmacodinâmica/farmacotécnica). No entanto, esses ensaios apresentam muitos problemas, já que os fármacos frequentemente estão presentes em baixas concentrações, apresentam forte ligação às proteínas e encontram-se em matrizes complexas como, por exemplo, o plasma e a urina. Os compostos presentes nessas matrizes biológicas podem causar interferências na identificação ou quantificação do analito ou serem incompatíveis com os sistemas cromatográficos de análise (CASSIANO *et al.*, 2006; QUEIROZ e LANÇAS, 2005; MULLET, 2007).

As proteínas plasmáticas (macromoléculas) representam um dos principais interferentes das amostras biológicas. Elas sofrem adsorção irreversível na superfície da coluna cromatográfica resultando na perda substancial da sua eficiência, na redução do seu tempo de vida e no aumento da pressão do sistema. Desse modo, a análise cromatográfica de substâncias presentes nessas matrizes requer um pré-tratamento da amostra, de maneira a eliminar esses interferentes levando a um aumento da detectabilidade e seletividade analítica. Esse preparo da amostra abrange as etapas de extração, concentração e purificação do analito, trazendo vantagens como o aumento da vida útil das colunas utilizadas, pré-concentração do analito na amostra e melhor separação dos compostos durante a análise (MULLET, 2007; SADILEK *et al.*, 2007; SOUVERAIN *et al.*, 2004; QUEIROZ e LANÇAS, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2001).

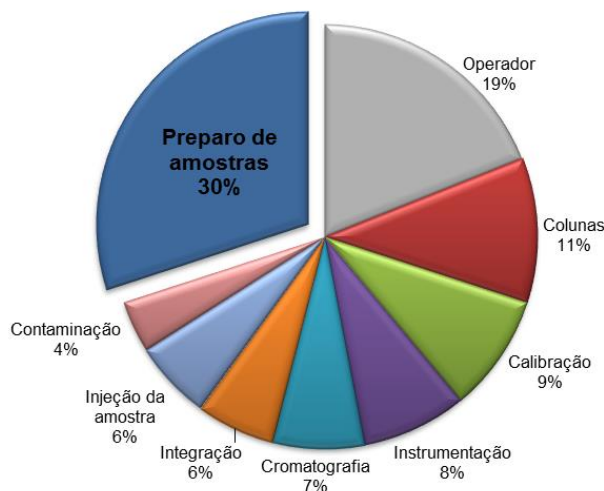
O preparo de amostra tem impacto em quase todas as etapas de um ensaio bioanalítico, sendo crítico para uma identificação inequívoca, confirmação e quantificação dos analitos. Nas últimas décadas, o foco dos estudos estiveram voltados para a otimização da etapa de análise propriamente dita representada principalmente pela cromatografia, com melhorias na velocidade, resolução, automação, instrumentação e análise de dados. Em contraste, o preparo de amostras e sua automação têm sido negligenciados e, geralmente, as análises

são realizadas utilizando métodos manuais convencionais que são grandes fontes de erro e que consomem muito tempo. Um estudo descrito na literatura aponta que 30% do erro total da análise está ligado à etapa de preparo de amostra (**Figura 1**) e, aproximadamente, 60% do tempo empregado na determinação analítica é consumido nesta etapa (**Figura 2**). Em um trabalho de revisão mais recente que o de Majors, Katatoka descreve que cerca de 80% do tempo de uma análise são consumidos nas etapas de amostragem e preparo de amostras (CHEN *et al.*, 2008; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; MAJORS, 1991; KATAOKA, 2003).

Figura 1 – Porcentagem de tempo gasto em cada etapa do desenvolvimento bioanalítico (MAJORS, 1991).



Figura 2 – Porcentagem dos erros gerados em cada etapa do desenvolvimento bioanalítico (MAJORS, 1991).



As técnicas utilizadas no preparo de amostras biológicas podem ser divididas em convencionais e modernas. As técnicas convencionais usualmente empregadas no preparo de amostras biológicas são a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*), a precipitação proteica (PP, do inglês *protein precipitation*) e a extração em fase sólida *off-line* com sorventes convencionais (SPE, do inglês *solid phase extraction*). No entanto, essas técnicas geralmente demandam tempo elevado para análise, consomem grande quantidade de solventes orgânicos e expõem os analistas ao contato com solventes geralmente tóxicos.

A necessidade de analisar amostras complexas estimulou o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras com menor consumo de solvente orgânico, maior seletividade, maior rapidez e capacidade de automação. Essas técnicas são comumente chamadas de modernas e atuam de maneira a reduzir a perda do analito, o tempo total de análise e a adsorção irreversível de proteínas à coluna analítica. Neste contexto, algumas estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de resolver os problemas encontrados com as técnicas convencionais. Dentre estas estratégias podem-se citar o uso de suportes especiais (tais como os polímeros de impressão molecular - MIPs, do inglês, *molecularly imprinted polymer* - e os meios de acesso restrito - RAM, do inglês,

restricted access media) e a miniaturização da SPE, como a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*) (CHEN *et al.*, 2008; CASSIANO *et al.*, 2006).

2.2 Técnicas convencionais para preparo de amostras biológicas

2.2.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)

A LLE, considerada uma técnica clássica de preparo de amostra, é baseada no coeficiente de partição do analito entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa. Ainda tem sido muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, visto que produz extratos limpos e com alta seletividade para alguns analitos (NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; CHANG *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001).

A eficiência da extração irá depender da afinidade do analito pelo solvente de extração, da razão das duas fases e do número de extrações realizadas. Para alguns sistemas, a constante de distribuição entre as fases pode ser alterada a partir de ajustes no pH (para uma faixa em que ácidos e bases estejam na forma não-ionizada), formação de par iônico e de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros (*salting out*) para redução da solubilidade dos analitos na fase aquosa, aumentando sua recuperação (SNYDER *et al.*, 1997).

A LLE apresenta as vantagens de ser simples e permitir o uso de uma grande variedade de solventes, fornecendo uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a possibilidade de contaminação da coluna cromatográfica. Por outro lado, dentre as desvantagens desta técnica podem ser citadas: perda do analito em amostras muito hidrofílicas, formação de emulsões, várias etapas de execução gerando um grande consumo de tempo de análise, problemas de descarte relacionados aos volumes requeridos relativamente grandes de amostras e de solventes, consumo de solventes orgânicos de alta

pureza e, em alguns casos, tóxicos (QUEIROZ *et al.*, 2001, QUEIROZ *et al.*, 2005; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009).

2.2.2 Precipitação Proteica (PP)

Um dos procedimentos de preparo de amostras mais comum é a precipitação proteica empregando solvente orgânico. É uma técnica relativamente rápida e barata, que não requer muita experiência do analista e com possibilidade de automação. Atualmente é uma das técnicas de preparo de amostras mais popular devido à sua alta recuperação. Quando comparada à LLE, tem menor necessidade de uso de solvente orgânico, além de não possuir o risco de formação de emulsão (MULLET, 2007; BAKHTIAR e MAJUMDAR, 2007; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009).

Nesta técnica um volume igual ou maior de um solvente orgânico é adicionado à amostra biológica que contém o analito e um padrão interno. Em seguida, a amostra é misturada e centrifugada resultando na formação de um pellet de proteína e o correspondente sobrenadante contendo o analito. Este último, após ser recolhido, será transferido, seco e reconstituído ou injetado diretamente na coluna (CHANG *et al.*, 2007; BAKHTIAR e MAJUMDAR, 2007).

Uma das principais desvantagens desta técnica é que o sobrenadante produzido é considerado relativamente “sujo”, visto que ainda pode conter uma quantidade significativa de componentes do plasma não-precipitados (ex. lipídeos, ácidos graxos, colesterol). Com isso, ao ser empregada a detecção por espectrometria de massas, o efeito da matriz ainda poderá ser observado devido à presença dessas moléculas endógenas, que irão competir com o analito durante a ionização, tornando a precipitação proteica uma técnica pouco específica e seletiva. Uma segunda desvantagem ocorre quando o composto analisado tem uma elevada porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, havendo então uma baixa recuperação do analito quando este for reconstituído. Por último, como existe a necessidade de adição de solvente na amostra, esta será sempre diluída em relação à concentração inicial (NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; BAKHTIAR e MAJUMDAR, 2007).

2.2.3 Extração em Fase Sólida (SPE) convencional

Atualmente, a SPE é uma das técnicas mais empregadas na extração e/ou concentração de analitos em matrizes complexas, sendo preferida a outros procedimentos tradicionais principalmente por ser mais eficiente em relação à recuperação do analito e por consumir menos tempo durante sua realização. Essa técnica é muito utilizada para sorção seletiva de analitos presentes em matrizes simples ou complexas e para sua concentração, precedendo as técnicas CLAE, cromatografia gasosa (CG), cromatografia iônica (CI) e outras técnicas de separação. Baseia-se em mecanismos de retenção semelhantes àqueles envolvidos em cromatografia a líquido em coluna (MAJORS, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001; KRISHNAM e IBRAHAM, 1994).

Essa técnica utiliza sorventes empacotados em cartuchos formados por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com partículas entre 40-60 µm de tamanho. A amostra é aplicada no topo do cartucho e eluída através do sorvente pelo uso de centrifugação ou pela aplicação de uma pressão positiva ou negativa (CHANG *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001; LINGEMAN e HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997; KRISHNAM e IBRAHAM, 1994).

O procedimento geralmente envolve cinco etapas:

1. ativação do sorvente, de maneira a deixar os sítios ativos disponíveis;
2. condicionamento do sorvente, ocorrendo solvatação da fase ligada para que seja possível carregar a amostra rapidamente;
3. introdução da amostra, em que ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
4. limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
5. eluição e coleta do analito (LINGEMAN e HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997; KRISHNAM e IBRAHAM, 1994; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Atualmente, um grande número de sorventes está disponível comercialmente. Os grupos mais frequentemente usados como sorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em três categorias: fase reversa, fase normal e troca iônica. A escolha do sorvente é um fator chave na SPE, visto que

controla parâmetros como seletividade, afinidade e capacidade. Essa escolha depende fortemente do analito e das suas propriedades físico-químicas, que devem definir as interações com o sorvente escolhido. Os sorventes mais utilizados podem variar de sílica quimicamente ligada e materiais de troca iônica, até materiais poliméricos e de acesso restrito (CHANG *et al.*, 2007; LINGEMAN e HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997; KRISHNAM e IBRAHAM, 1994; QUEIROZ *et al.*, 2001; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009).

Basicamente, há duas maneiras de se escolher um sorvente. Ele pode possuir elevada afinidade pelo analito, retendo-o e excluindo os componentes não requeridos da amostra; ou apresentar baixa afinidade pelo analito, permitindo sua passagem enquanto retém os demais componentes. Para aumentar a seletividade da extração podem ser feitas sucessivas extrações com suportes que possuem empacotamentos diferentes, utilizar sorventes diferentes em um mesmo suporte dispostos em camadas como uma coluna de extração ou utilizar fases mistas em um mesmo suporte (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Dentre as desvantagens da SPE podem ser citadas: perda de amostra pela adsorção na parede do sistema ou pela volatilização do analito, introdução de impurezas presentes nos solventes e reagentes utilizados, limitação do uso de baixas vazões devido às menores dimensões dos cartuchos, utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e o grande número de etapas operacionais para sua execução. Além disso, quando sorventes convencionais são empregados, podem ser comum a baixa seletividade e o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; LINGEMAN e HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997).

2.3 Técnicas modernas para preparo de amostras biológicas

Devido à sua melhor eficiência na recuperação dos analitos, a técnica SPE tem sido amplamente empregada nos estudos de preparo de amostras. Com o intuito de contornar algumas das suas desvantagens, novas configurações cromatográficas e o uso de sorventes mais seletivos estão sendo avaliados em

SPE para o preparo de amostras em matrizes mais complexas. Dentre as novas configurações podem ser citadas a SPME e a MEPS. Já dentre os sorventes mais seletivos com desenvolvimento mais recente, citam-se os MIPs e RAM (QUEIROZ *et al.*, 2001).

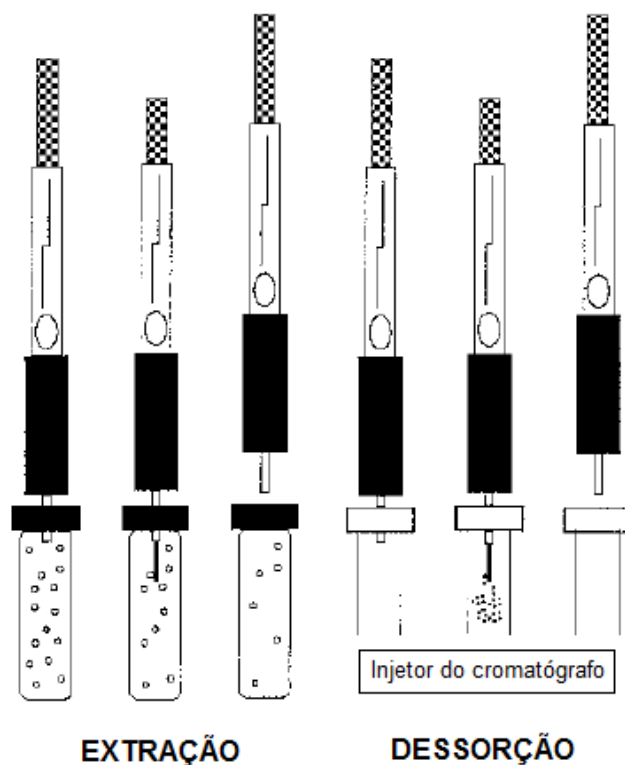
2.3.1 Configurações para SPE modernas

2.3.1.1 Microextração em fase sólida (SPME)

É uma técnica de preparo de amostras moderna, desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1990 e introduzida no mercado pela Supelco em 1992. Seu mecanismo envolve uma adsorção/absorção e dessorção simples e efetiva que elimina o uso de solventes por meio do uso de uma microfibrilha de sílica fundida modificada quimicamente. Ao contrário dos cartuchos de SPE, as seringas de SPME permitem a combinação das fases do preparo de amostras (amostragem, isolamento e concentração do analito) em uma única etapa. Desse modo, há uma redução do tempo gasto, do custo e do uso de solventes orgânicos (QUEIROZ *et al.*, 2001; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; CHEN *et al.*, 2008; HENNION, 1999; VALENTE e AUGUSTO, 2002; KOLE *et al.*, 2010; ARTHUR e PAWLISZYN, 1990).

Nesta técnica, uma fibra de sílica fundida de pequeno diâmetro (110 a 160 μm), coberta por um polímero orgânico sorvente ou por um sólido adsorvente com espessuras que variam de 7 a 100 μm , está inserida em um microtubo de aço inoxidável localizado dentro da agulha de uma seringa modificada. A fibra é então posicionada em contato com a amostra, onde os analitos irão sofrer partição com a fase estacionária por meio de um processo de equilíbrio entre as fases. O procedimento típico envolve duas etapas essenciais: extração e dessorção do analito no equipamento cromatográfico (**Figura 3**) (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2001; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; ARTHUR e PAWLISZYN, 1990; KOLE *et al.*, 2010; VALENTE e AUGUSTO, 2000).

Figura 3 – Esquemática da técnica SPME. Adaptado de Valente, 2000.



O processo de extração pode ser realizado de duas maneiras, por meio da abordagem *headspace*, em que a amostra é aquecida e os componentes voláteis são sorvidos na fibra ou mantendo a fibra em contato direto com a solução da amostra. Esta etapa pode ser otimizada para algumas condições, como por exemplo, pH, concentração de sal, volume da amostra, agitação, temperatura e tempo de extração. Após a extração, os analitos presentes na fibra são desorvidos termicamente diretamente no injetor de um cromatógrafo a gás ou desorvidas em solvente orgânico para posterior injeção em um cromatógrafo a líquido (QUEIROZ *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2008; KOLE *et al.*, 2010; ARTHUR e PAWLISZYN, 1990; QUEIROZ e LANÇAS, 2005).

Dentre os materiais de revestimento para fase estacionária disponíveis comercialmente, podem ser citados: polidimetilsiloxano para extração de analitos menos polares; poliacrilato, polidimetilsiloxano–divinilbenzeno e carbowax–divinilbenzeno para extração de analitos polares, sendo especialmente usados para fenóis, aminas e álcoois respectivamente; carboxeno–polidimetilsiloxano, para extração de analitos voláteis de baixo peso molecular; e para a extração de

uma ampla faixa de analitos pode ser utilizado o divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano. As fibras estão disponíveis em diferentes espessuras, com cobertura única, combinada ou com co-polímeros, porém, mesmo assim suas variações ainda são limitadas, o que restringe o uso da SPME (KOLE *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2008).

Dentre as vantagens da SPME, podem ser citadas sua simplicidade e rapidez em relação à LLE e à SPE, a obtenção de extratos mais limpos, o que permite a automação das análises e a reutilização das fibras extratoras, além de não utilizar solventes orgânicos. Por outro lado, a utilização desta técnica requer que o analito seja volátil e termicamente estável, sua recuperação é considerada menor do que as obtidas na LLE e na SPE e sua extração não é totalmente eficiente, podendo ser encontradas interferências de traços de substâncias endógenas, formando um extrato considerado “sujo” (NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2001; QUEIROZ e LANÇAS, 2005).

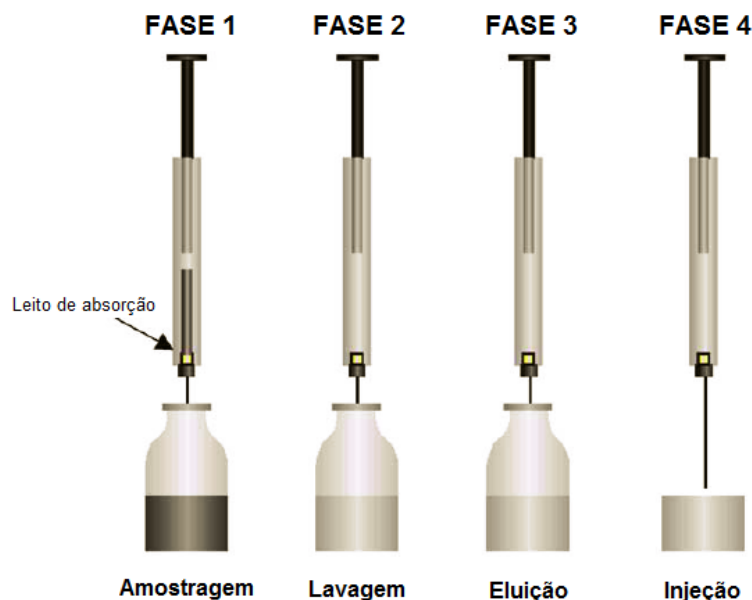
2.3.1.2 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

É uma técnica recente, desenvolvida por Abdel-Rehim e colaboradores em 2004 no laboratório da empresa AstraZeneca na Suíça. Pode ser considerada uma miniaturização da SPE convencional, sendo descrita como uma pequena coluna analítica dentro de uma seringa (ABDEL-REHIM, 2010; VLCKOVÁ *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2010).

Nesta técnica, a amostra biológica é aspirada por um amostrador automático para dentro de uma seringa que contém aproximadamente 1 mg de sorvente sólido empacotado, responsável pela sorção dos analitos. Assim como a SPE, vários materiais sortivos podem ser utilizados como fase sólida, como por exemplo: sílica, RAM ou MIPs. Após concluir a etapa de sorção, o suporte é lavado uma vez com água para remoção das proteínas e outros materiais interferentes e, em seguida, é realizada a eluição dos analitos pela passagem de um solvente orgânico (**Figura 4**). Como as dimensões do leito da MEPS são proporcionais em escala às do leito da SPE convencional, a maioria dos métodos por SPE podem ser adaptados para MEPS apenas pelo ajuste dos volumes de

amostra e reagentes (ABDEL-REHIM, 2004, 2010; VLCKOVÁ *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2010).

Figura 4 – Esquematização da técnica MEPS. Adaptado de Abdel-Rehim, 2004.



Quando comparada com a SPE convencional, duas grandes diferenças podem ser observadas. Em relação à forma de empacotamento do material sorvente, observa-se que enquanto no MEPS ele se encontra integrado diretamente à seringa, na SPE ele está localizado em uma coluna separada; já quanto ao número de extrações que podem ser realizados por unidade, MEPS permite um maior número de análises enquanto a coluna de SPE convencional só pode ser utilizada uma vez. Quando comparada com a SPME, esta por apresentar uma fibra mais sensível à natureza da matriz é considerada menos robusta do que a MEPS. Além disso, MEPS geralmente apresenta recuperações da ordem de 60-90% enquanto apenas 10% são recuperados pela SPME (ABDEL-REHIM, 2004, 2010).

Uma das principais vantagens desta técnica é a facilidade de automação. Visto que esta técnica pode ser conectada *online* em instrumentos para cromatografia gasosa e líquida sem nenhuma modificação do aparato cromatográfico, a eluição dos analitos pode ser realizada diretamente no sistema de injeção do instrumento de análise. Uma segunda característica desta técnica que também

favorece a sua automação é o volume de solvente empregado na eluição, que é adequado para a injeção direta do analito nos sistemas CLAE ou GC. Dentre suas demais vantagens podem ser citadas: fácil uso, rapidez, possibilidade de uso para baixos volumes de amostra e flexibilidade dos materiais de empacotamento, que permitem melhorar a seletividade e criar condições de uso mais adequadas (CHAVES *et al.*, 2010; ABDEL-REHIM, 2004, 2010; SOMAINI *et al.*, 2011; VLCOVAK *et al.*, 2011).

2.3.2 Sorventes para SPE modernas

2.3.2.1 Polímeros de Impressão Molecular (MIPs)

Os polímeros molecularmente impressos são materiais sintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular por meio de sítios de reconhecimento específicos para certas moléculas. Nos últimos anos vêm sendo muito pesquisados devido à sua estabilidade, possibilidade de aplicação em uma ampla faixa de moléculas alvo, além de ser uma técnica relativamente fácil e de baixo custo de preparo. Visto que podem ser aplicados em sistemas de extração por SPE (MISPE), estão sendo muito utilizados para o preparo de amostras tanto para modelos de extração para compostos específicos, quanto para um grupo ou classe de substâncias análogas. Além da concentração do analito, o uso de MIPs em SPE possibilita sua separação seletiva a partir de uma matriz complexa, fatores cruciais para determinações quantitativas. O primeiro procedimento de MIP utilizado em SPE foi reportado por Sellergren em 1994, para a determinação seletiva de pentamidina em amostras de urina (SELLERGREIN, 1994; CASSIANO *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2007; HENNION, 1999; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; HAGINAKA, 2009).

O preparo dos MIPs envolve a polimerização de monômeros ao redor de uma molécula modelo por meio de um agente de ligação cruzada na presença de um iniciador; com isso há a formação de um complexo molécula modelo – monômero. Em seguida, a molécula modelo é removida por meio de uma reação química ou extração, resultando em uma matriz polimérica com sítios de ligação específicos em tamanho, forma e posição de grupos funcionais, para a molécula

modelo utilizada (CASSIANO *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2007; HENNION, 1999; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009).

Podem ser sintetizados a partir de três técnicas de impressão molecular: não-covalente, covalente e híbrida, que determinam o tipo de ligação utilizada durante a formação do complexo molécula modelo – monômero e, conseqüentemente, definem o tipo de ligação que ocorrerá entre a molécula a ser analisada e o MIP. Na impressão não-covalente primeiro formam-se os polímeros e, em seguida, o complexo com a molécula modelo é formado por interações não-covalentes. Esta técnica traz a vantagem de promover uma rápida ligação entre as moléculas analisadas e o MIP, porém as condições de polimerização devem ser escolhidas cuidadosamente para não ocorrer a formação de sítios de ligação não-específicos. Por outro lado, na impressão covalente, o complexo é formado antes de a polimerização ocorrer. Essa ordem de síntese permite o uso de uma grande variedade de condições de polimerização, no entanto, torna o processo trabalhoso e menos econômico, além de gerar uma ligação lenta entre a molécula analisada e o MIP. Já no processo híbrido (semi-covalente), os polímeros são preparados como na impressão covalente, enquanto a ligação da molécula modelo é feita a partir de interações não-covalentes. Desse modo, as principais vantagens das duas técnicas citadas anteriormente são combinadas, a estabilidade e estequiometria do complexo e a rápida ligação da molécula analisada ao MIP (HE *et al.*, 2007; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009).

A técnica MISPE vem sendo muito utilizada no preparo de amostras e enriquecimento de analitos em diferentes matrizes, principalmente por ser considerada uma técnica estável (em altas temperaturas, elevados pH e em solventes orgânicos), seletiva, reutilizável e por possuir uma preparação fácil e rápida (HENNION, 1999; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; HAGINAKA, 2009).

Porém, ainda existem algumas desvantagens associados ao uso de MISPE. Primeiro, a dificuldade de remoção da molécula modelo, mesmo após extensa lavagem, o que gera um risco potencial de perda dessas moléculas durante a extração da amostra. Este problema pode interferir seriamente na exatidão e precisão de análises de compostos em nível de traço em matrizes complexas e,

consequentemente, nas suas quantificações. Outro fator que deve ser considerado é a dificuldade de estabelecer uma dessorção quantitativa e relativamente rápida do analito, devido à elevada especificidade e avidéz do MIP pelo analito. Uma terceira desvantagem está relacionada especificamente à preparação pela técnica de impressão não-covalente, a mais utilizada ultimamente. Por gerar um baixo rendimento de sítios de reconhecimento específicos, essa técnica resulta em uma baixa capacidade de carregamento da amostra e em um alto índice de ligações não-específicas (HENNION, 1999; NOVÁKOVÁ e VLCKOVÁ, 2009; HAGINAKA, 2009).

2.3.2.2 Meios de Acesso Restrito (RAM)

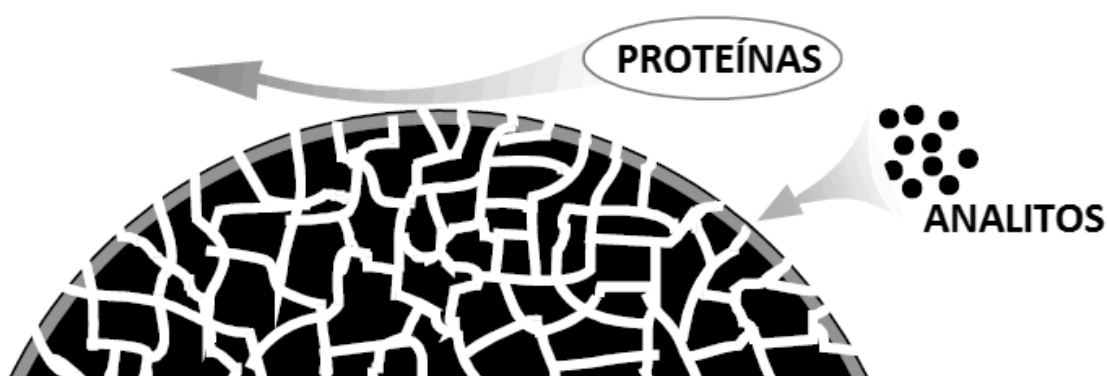
O termo “meio de acesso restrito” foi introduzido por Desilets e colaboradores em 1991 para descrever um conjunto de suportes que permitem a injeção direta de amostras biológicas em sistemas cromatográficos de fase reversa, ou seja, sem a necessidade da etapa de preparo de amostras. Mesmo antes da definição desta nomenclatura, algumas colunas com esse tipo de fase já haviam sido desenvolvidas e, devido ao seu sucesso, motivaram o desenvolvimento de novas fases mais efetivas (Tabela 1) (DESILETS *et al.*, 1991).

Tabela 1 – Cronologia do desenvolvimento dos principais suportes RAM.

Ano	RAM	Referência
1982	fase hidrofóbica com proteína imobilizada (BSA)	Yoshida, 1982
1985	suporte com superfície interna de fase reversa	Hagestam, 1985
1988	fase hidrofóbica blindada	Gish, 1988
1990	material funcional misto	Haginaka, 1990
1991	introdução do termo "meio de acesso restrito"	Desilets, 1991
1991	superfície semipermeável	Desilets, 1991
1991	fase sílica alquil-diól	Boos, 1991
1994	fase hidrofóbica com proteína imobilizada (AGP)	Hermansson, 1994
1997	classificação unimodal x bimodal	Boos, 1997

Com os suportes RAM é possível separar os analitos das matrizes que contém componentes de elevado peso molecular, como por exemplo as proteínas plasmáticas, por meio da combinação de mecanismos de exclusão por tamanho e/ou interações hidrofóbicas. Desse modo, o acesso de macromoléculas à fase estacionária é restrito enquanto que os analitos tem acesso livre aos sítios de adsorção do suporte (**Figura 5**) (DESILETS *et al.*, 1991).

Figura 5 – Estrutura da partícula do meio de acesso restrito. Adaptado de SADILEK, 2007.



Os sorventes RAM podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de exclusão macromolecular, que podem ser físicos ou químicos. A barreira física é baseada na restrição causada pelo tamanho do diâmetro do poro da partícula. Já a barreira química ocorre devido a uma rede de polímeros e/ou proteínas ligados covalentemente ou adsorvivamente à superfície externa da sílica. Essa conformação confere à superfície uma característica hidrofílica impedindo a adsorção de macromoléculas na fase estacionária, mas permitindo a retenção seletiva de compostos de baixo peso molecular por partição, troca iônica ou afinidade cromatográfica (adsorção por afinidade pela fase estacionária hidrofóbica) (HAGESTAM e PINKERTON, 1985; CASSIANO *et al.*, 2006; BOOS e GRIMM, 1999; CHEN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2006; MULLET, 2007, SADÍLEK *et al.*, 2007).

Em 1997, Boos e Rudolphi complementaram a classificação criando uma subdivisão de acordo com as superfícies químicas dos sorventes (**Tabela 2**). As fases de superfície bimodal apresentam uma superfície externa hidrofílica e a superfície interna hidrofóbica. Nesta categoria incluem-se os suportes de

superfície interna de fase reversa (ISRP, do inglês *internal surface reversed phase*), fase sílica alquil-diol (ADS, do inglês *alkil-diol sílica*), superfície semipermeável (SPS, do inglês *semipermeable surface*) e fase hidrofóbica com proteína imobilizada (*protein-coated sílica*). Por outro lado, as fases de superfície unimodal possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas simultaneamente tanto para sua superfície interna quanto externa da sílica. Neste grupo são inclusos os suportes com fase hidrofóbica blindada (SHP, do inglês *shielded hydrophobic phase*) e com material funcional misto (MFP, do inglês *mixed-functional phase*) (BOOS e RUDOLPHI, 1997; CASSIANO *et al.*, 2006; MULLET, 2007).

Tabela 2 – Classificação das colunas RAM de acordo com as superfícies químicas dos seus sorventes.

Classificação	Barreira química	Barreira física
Bimodal	superfície semi-permeável	superfície interna de fase reversa
	fase hidrofóbica com proteína imobilizada	sílica alquil-diol
Unimodal	fase funcional mista	
	fase hidrofóbica blindada	

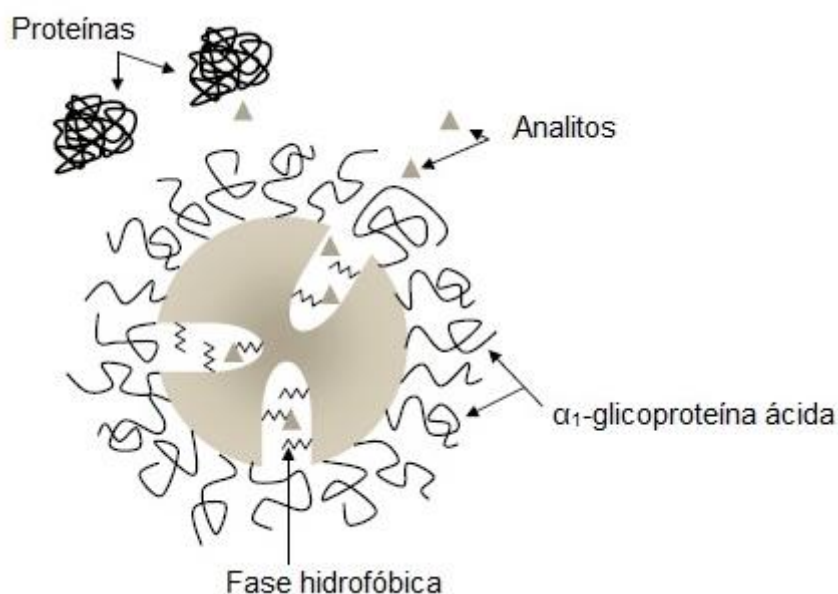
2.3.2.2.1 Fase hidrofóbica com proteína imobilizada (*protein-coated silica*)

Em 1982, Yoshida e colaboradores desenvolveram uma coluna empacotada com partículas de sílica octadecil, com superfície externa coberta por uma proteína plasmática imobilizada, a albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*). Esta coluna permitiu a determinação direta de fármacos em plasma humano com exatidão, reprodutibilidade e simplicidade (YOSHIDA *et al.*, 1982).

Já em 1994, Hermansson e Grahn desenvolveram uma coluna utilizando os mesmos princípios propostos por Yoshida, chamada comercialmente de BioTrap. Porém, neste estudo, a proteína imobilizada utilizada para a cobertura externa das partículas de sílica porosa foi a proteína plasmática humana α_1 -glicoproteína ácida (AGP, do inglês *α_1 -acid glycoprotein*) (**Figura 6**), o que tornava o exterior das partículas compatível com amostras proteínicas (HERMANSSON e GRAHN, 1994).

Figura 6 - Representação esquemática da fase hidrofóbica com proteína imobilizada.

Adaptado de Souverain, 2004.



2.3.2.2 Superfície interna de fase reversa (ISRP)

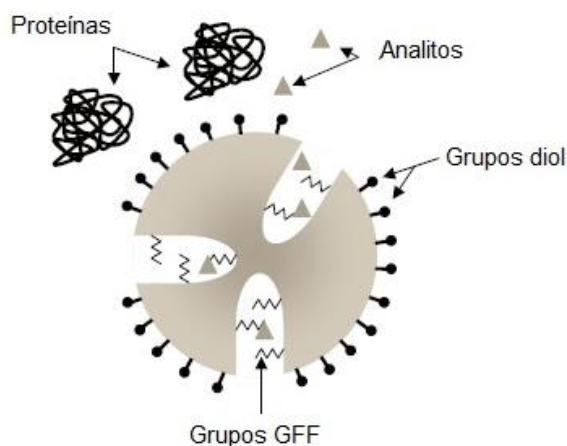
Esta fase foi introduzida por Hagestam e Pinkerton em 1985, sendo caracterizada por dois grupos funcionais diferentes ligados às superfícies. Na superfície externa tem-se a fase hidrofílica, enquanto na superfície interna dos poros do sorvente está ligada a fase hidrofóbica (**Figura 7**). O diâmetro interno do poro de 8 nm funciona como uma barreira física para a passagem de macromoléculas, permitindo somente o acesso de compostos com baixo peso molecular. A fase hidrofóbica da superfície interna é composta por um tripeptídeo que interage covalentemente com as moléculas menores, além de limitar a adsorção de eventuais proteínas que consigam acesso (HAGESTAM e PINKERTON, 1985; SOUVERAIN *et al.*, 2004; SADILEK *et al.*, 2007).

Para sua produção, a partícula de sílica é inicialmente modificada com uma fase ligada de glicerilpropil. A esta fase ligam-se covalentemente polipeptídios com meios hidrofóbicos susceptíveis a quebra enzimática (glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina, GFF). O suporte derivatizado é então tratado com enzimas (carboxipeptidases) para remoção das espécies hidrofóbicas (fenilalanina) somente da superfície externa. Como as enzimas selecionadas são muito

grandes para conseguir acesso à superfície interna, a fase hidrofóbica desta superfície permanece intacta (HAGESTAM e PINKERTON, 1985).

Porém, a síntese deste suporte gerava um material parcialmente polimérico, o que dificultava sua reprodução além de apresentar baixa retenção para alguns compostos. Desse modo, uma segunda geração de suportes GFF (GFFII) foi desenvolvida por Perry e colaboradores em 1992 que, por alteração de síntese, possuía maior extensão da superfície interna dos poros recoberta por polipeptídios. Esses suportes possuíam maior eficiência, retenção e reprodutibilidade (PERRY *et al.*, 1992; SOUVERAIN *et al.*, 2004; BOOS e GRIMM, 1997).

Figura 7 - Representação esquemática da fase ISRP. Adaptado de Souverain, 2004.

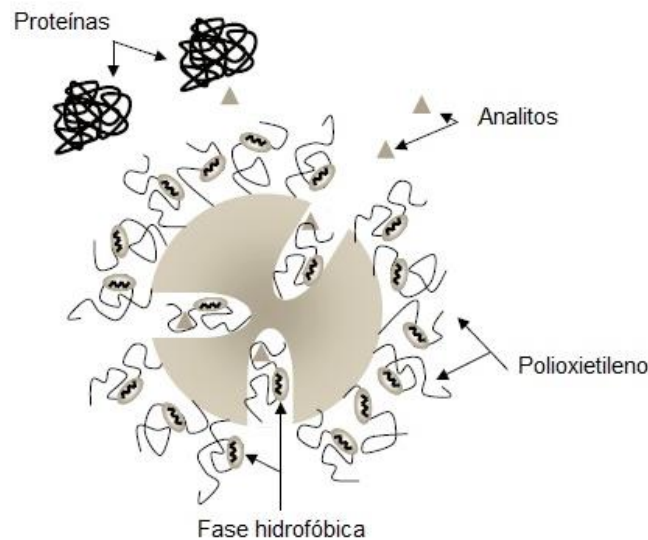


2.3.2.2.3 Fase hidrofóbica blindada (SHP)

Em 1988, Gish e colaboradores desenvolveram um material que consiste em uma fase ligada polimérica contendo regiões hidrofóbicas (grupos fenil) revestidas por uma rede hidrofílica (polioxietileno) (**Figura 8**). Essa rede forma uma interface de água solvatada que permite a passagem dos analitos que irão interagir com os grupos hidrofóbicos do suporte de sílica, enquanto moléculas grandes, como as proteínas, são impedidas de tal interação pelo escudo hidrofílico. Este suporte está disponível comercialmente pelo nome Hisep SHP

(Supelco, EUA) (GISH *et al.*, 1988; SOUVERAIN *et al.*, 2004, SADILEK *et al.*, 2007).

Figura 8 - Representação esquemática da fase SHP. Adaptado de Souverain, 2004.



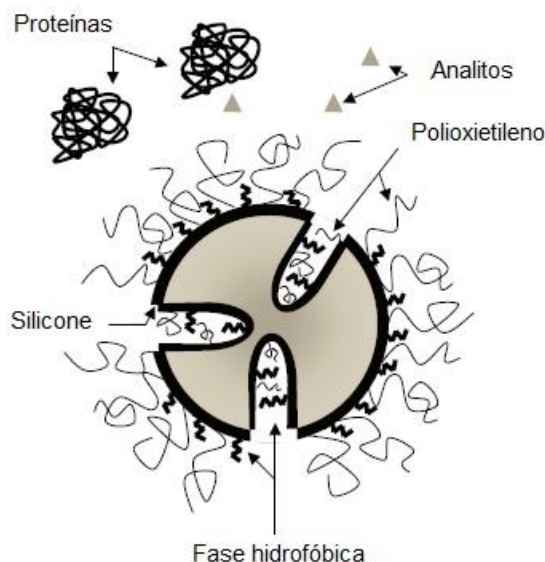
2.3.2.2.4 Material funcional misto (MFP)

Em 1990, Haginaka e colaboradores desenvolveram um novo suporte para injeção direta de fármacos em plasma humano a partir de um suporte de sílica contendo grupos fenil, butil ou octil como fase hidrofóbica e grupos diol como fase hidrofílica, chamado de fase funcional mista (**Figura 9**). Além da barreira física conferida pelo tamanho dos poros de suas partículas, a exclusão de macromoléculas deste suporte também é possível devido à funcionalidade mista hidrofóbica e hidrofílica que impede sua acumulação na superfície do suporte (HAGINAKA *et al.*, 1990).

Na tentativa de combinar a tecnologia de proteína-imobilizada com o material funcional misto, Kanda e colaboradores desenvolverem em 1994 um suporte comercializado com o nome de Capcell Pak MF. Neste suporte, a fase funcional mista contém grupos estirenos (hidrofóbicos) e oligoglicerol ou polioxietileno (hidrofílicos) ligados à sílica immobilizada com proteína. Nesta fase, as longas cadeias de polioxietileno limitam o acesso de macromoléculas e os componentes

da matriz de amostras biológicas irão interagir somente com a rede polimérica hidrofílica não adsortiva, sendo então eluídas (KANANDA *et al.*, 1994; SOUVERAIN *et al.*, 2004; SADILEK *et al.*, 2007).

Figura 9 - Representação esquemática da fase MFP. Adaptado de Souverain, 2004.



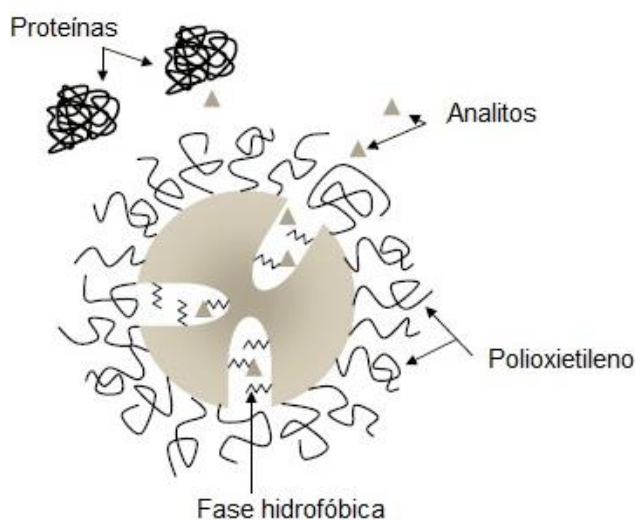
2.3.2.2.5 Superfície semipermeável (SPS)

Desilets e colaboradores observaram que quando um polímero é ligado à uma superfície de fase reversa, forma-se uma camada hidrofílica semi-permeável capaz de restringir o acesso de proteínas à fase estacionária (**Figura 10**). Os meios externo e interno deste material são sintetizados independentemente e ligados à superfície das partículas de sílica, sendo que a superfície externa composta por um polímero de polioxietileno repele as macromoléculas, enquanto a superfície interna (fase reversa hidrofóbica) retêm os analitos menores que penetraram (DESILETS *et al.*, 1991; SADILEK *et al.*, 2007).

Inicialmente, esses suportes eram obtidos pela adsorção de um polímero de polioxietileno à superfície externa dos alquil-silanos, ou seja, coberturas não covalentes de cadeias hidrofóbicas. No entanto, ocorria eluição gradativa da camada polimérica, requerendo uma frequente regeneração da fase

estacionária. Para os suportes de segunda geração, as coberturas foram substituídas por cadeias de polietilenoglicol covalentemente ligadas diretamente na superfície da fase estacionária. Esses suportes estão comercialmente disponíveis como SPS pela empresa Regis Technologies (DESILETS *et al.*, 1991; SADILEK *et al.*, 2007).

Figura 10 - Representação esquemática da fase SPS. Adaptado de Souverain, 2004.

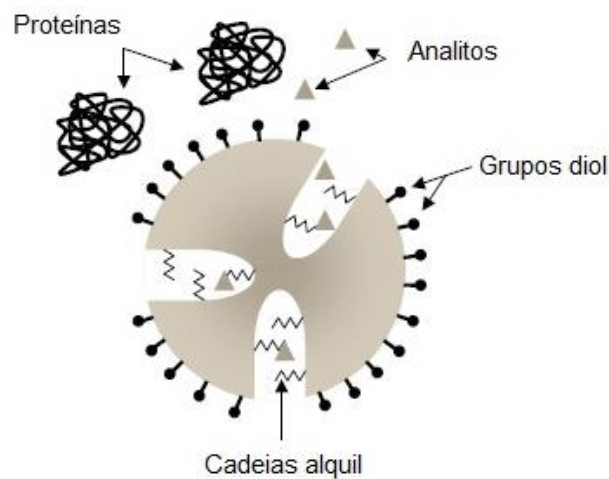


2.3.2.2.6 Sílica alquil-diol (ADS)

A fase ADS é considerada um dos materiais para coluna RAM mais populares. Foi desenvolvida por Boos e colaboradores no início dos anos 90, tendo sua estrutura semelhante às partículas GFF (**Figura 11**). Sua ampla capacidade de retenção hidrofóbica permite a extração de uma grande variedade de compostos. Seu mecanismo de exclusão macromolecular se baseia em uma barreira física e a adsorção desses compostos ao suporte é impedida pelos grupos hidrofílicos (glicerildiol) ligados à superfície externa. Esse exterior hidrofílico é produzido por enzimas que hidrolisam ésteres de ácido graxo exclusivamente da superfície externa do suporte. Essa fase RAM é caracterizada pela disponibilidade de diferentes fases reversas (C4, C8 ou C18) para a superfície interna (SOVERAIN *et al.*, 2004; BOSS *et al.*, 1995; BOOS e GRIMM, 1999).

Em 2002, um novo suporte ADS chamado XDS (do inglês *exchange diol silica*) foi desenvolvido por Chiap e colaboradores. Neste suporte, além dos grupos diol ligados à superfície externa da sílica, que previnem a adsorção de proteínas plasmáticas, existem grupos de ácido sulfônico ligados à sílica via espaçadores alquil de cadeia curta. Com isso, o sorvente apresenta forte propriedade de troca catiônica em relação aos compostos de baixo peso molecular (CHIAP *et al.*, 2002).

Figura 11 - Representação esquemática da fase ADS. Adaptado de Souverain, 2004.



2.4 Cromatografia multidimensional

Cada vez mais a SPE vem sendo realizada em modo *online* (automatizado). Quando comparada com os métodos manuais (*off-line*), a SPE automatizada requer menor manuseio da amostra, gera uma maior recuperação do analito, é mais reprodutível e, por ser realizada em um sistema fechado, apresenta menor chance de oxidação da amostra ou de evaporação do solvente (KRISHNAM e IBRAHAM, 1994).

As fases RAM possuem aplicação analítica muito versátil, podendo ser utilizadas tanto como coluna única, como no modo multidimensional. No modo de coluna única, o procedimento analítico envolve três etapas: extração da amostra, eluição do analito e reequilíbrio do suporte. A amostra biológica é injetada

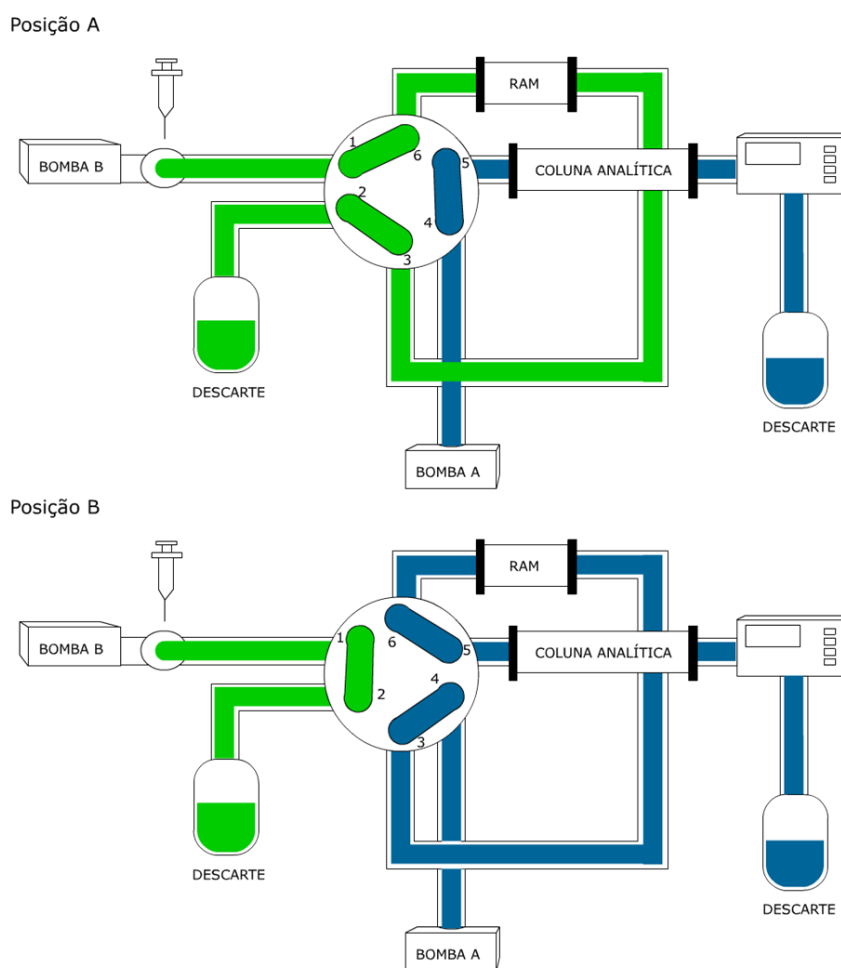
diretamente na coluna RAM, utilizando uma fase móvel apropriada, de maneira a garantir a extração seletiva do analito a partir dos componentes da matriz biológica (LIMA *et al.*, 2006; MULLET, 2007; SADILEK *et al.*, 2007; SOUVERAIN *et al.*, 2004).

O modo multidimensional, também chamado de *column-switching*, foi introduzido em 1973 por Huber e colaboradores. Nesta técnica cromatográfica, a amostra é separada por um sistema de colunas, que podem ser semelhantes ou diferentes, de maneira a aumentar a seletividade da análise e a capacidade do pico. As diferentes dimensões do sistema são controladas por uma válvula automática que irá direcionar a passagem da amostra através do sistema cromatográfico (BOOS *et al.*, 1995; HUBER *et al.*, 1973).

Quando a coluna RAM é utilizada na primeira dimensão, ela atua como uma pré-coluna para uma coluna analítica acoplada em sequência. Com isso, é possível fracionar e eluir as macromoléculas da matriz biológica e, simultaneamente, permitir a pré-concentração e pré-separação dos analitos por meio de uma seletividade adicional baseada na sua fase extratora (MULLET, 2007; CHEN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2006; SOUVERAIN *et al.*, 2004).

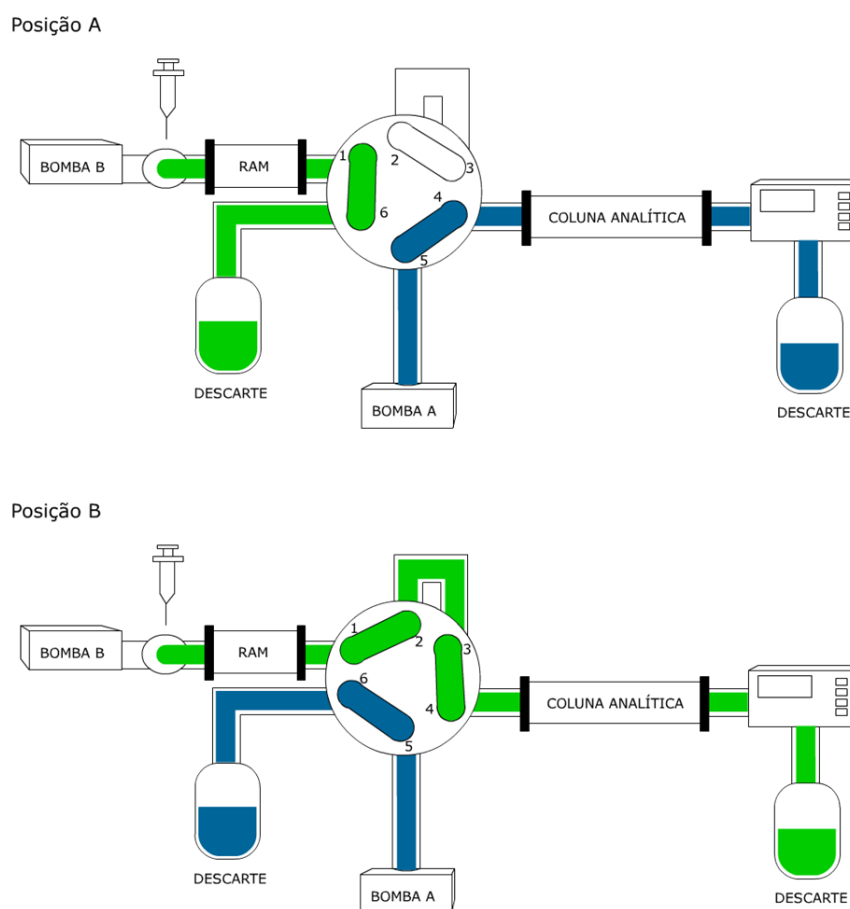
Em um primeiro momento (posição A) do modo *backflush*, o plasma é injetado na primeira dimensão do sistema e carregado para a coluna RAM através da fase móvel de extração, fornecida pela bomba B. Uma vez na coluna RAM, ocorrerá a exclusão das proteínas plasmáticas, que seguirão para o descarte, e a sorção dos analitos à coluna. Simultaneamente, na segunda dimensão do sistema, a fase móvel analítica fornecida pela bomba A irá condicionar a coluna analítica durante todo o período de exclusão proteica. Já no segundo momento (posição B), a válvula automática irá girar de maneira que a fase móvel analítica comece a passar inicialmente pela coluna RAM e, em seguida através da coluna analítica. Nesta posição, a fase móvel analítica irá percorrer a coluna RAM no sentido oposto ao da fase móvel extratora durante a posição A. Desse modo, os analitos retidos na coluna RAM serão eluídos para a coluna analítica, onde ocorrerá a separação (**Figura 12**).

Figura 12 – Esquema da configuração do sistema *column-switching* no modo de eluição *backflush*.



Na posição A do modo *foreflush*, a configuração do sistema estará montada da mesma maneira que no modo *backflush*, tanto na primeira quanto na segunda dimensão do sistema. No entanto, após a viragem da válvula para a posição B, a fase móvel analítica irá percorrer a coluna RAM no mesmo sentido que a fase móvel de exclusão percorreu na primeira posição. Para isso, é necessário que a bomba B seja capaz de eluir tanto a fase móvel de exclusão quanto a analítica (Figura 13) (MULLET, 2007; CHEN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2006; SOUVERAIN *et al.*, 2004).

Figura 13 – Esquema da configuração do sistema *column-switching* no modo de eluição *foreflush*.



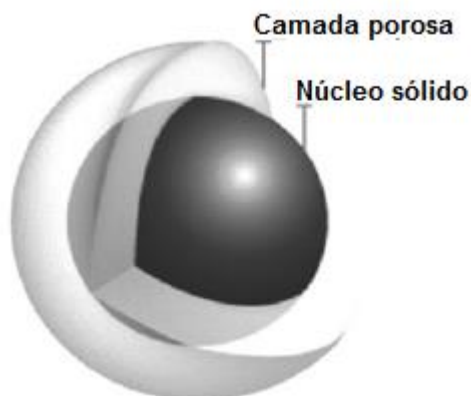
Uma grande aplicação do sistema *column-switching* é na determinação de fármacos em fluídos biológicos por injeção direta no equipamento cromatográfico. Se uma amostra biológica sem um preparo prévio for injetada diretamente em uma coluna de fase reversa, as macromoléculas contidas na matriz podem adsorver irreversivelmente na coluna, mudando suas características e aumentando a pressão do sistema. Utilizando uma coluna RAM acoplada a uma coluna analítica em um sistema multidimensional a amostra biológica pode ser injetada diretamente, visto que os interferentes serão desviados da coluna analítica, via válvula, para o descarte. Dentre as vantagens do sistema *column-switching* podem ser citadas a injeção direta de fluidos biológicos, a concentração e recuperação do analito e a maior segurança no manuseio de amostras infecciosas ou perigosas (MAJORS, 2005; BOOS e GRIMM, 1999; MULLET, 2007).

2.5 Coluna cromatográfica com partículas de núcleo fundido

Sempre existiu um grande interesse dos pesquisadores em desenvolver técnicas e aparatos que permitissem realizar separações cada vez mais rápidas em equipamentos CLAE sem perder o poder de resolução. Uma maneira de alcançar esse objetivo é aumentar a vazão da fase móvel. No entanto, quando se usa colunas com partículas com tamanho convencional (3,0 ou 5,0 μm), a eficiência da separação é diminuída consideravelmente em vazões elevadas. Essa limitação foi superada com o desenvolvimento de fases estacionárias com diâmetros menores que 2,0 μm , que possuem a propriedade de manter elevada capacidade de separação mesmo em altas vazões de fase móvel. No entanto, essa redução do tamanho das partículas leva a um aumento da pressão dos sistemas cromatográficos, sendo necessário o uso de instrumentos específicos capazes de suportar esse aumento, como é o caso dos equipamentos UHPLC (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) (DESTEFANO *et al.*, 2007; ABRAHIM *et al.*, 2010; ALI *et al.*, 2010; CUNLIFFE e MALONEY, 2007).

De modo a contornar esses problemas, foram desenvolvidas colunas com partículas com um núcleo sólido cobertas com uma camada porosa, possuindo essencialmente as mesmas propriedades físico-químicas das partículas totalmente porosas (**Figura 14**). A diferença é que, nas partículas de núcleo fundido, a difusão do analito ocorre somente através da camada porosa, levando à diminuição do caminho médio a ser percorrido pelo analito. Desse modo, a difusão do soluto é mais rápida, reduzindo conseqüentemente a taxa de transferência de massa do analito através da fase estacionária, possibilitando com isso, o uso de altas velocidades de fase móvel (GUIOCHON e GRITTI, 2011; CUNLIFFE e MALONEY, 2007; DESTEFANO *et al.*, 2007; CAVAZZINI *et al.*, 2007).

Figura 14 – Representação esquemática de uma partícula de núcleo fundido. Adaptado de Maldaner, 2010.



As colunas com partículas de núcleo fundido foram consideradas um grande avanço nas análises cromatográficas. Seu desenvolvimento teve início no final da década de 60, com os trabalhos de Horváth e colaboradores, a partir do conceito de partículas peliculares e sua aplicação em resinas de troca iônica para separação dos constituintes do ácido nucléico. Um estudo realizado por Kirkland em 1969, deu início à primeira geração de partículas de núcleo fundido com o desenvolvimento de partículas com porosidade controlada, constituídas por um núcleo sólido de sílica envolto por uma camada porosa, apresentando um diâmetro total entre 30 e 40 μm (HORVATH *et al.*, 1967; KIRKLAND, 1969).

Em 1992, Kirkland desenvolveu a segunda geração de partículas de núcleo fundido, chamadas de Poroshell (Agilent Technologies), aplicando-as na separação de proteínas e polímeros sintéticos. Essas partículas apresentavam um diâmetro total de 7 μm e espessura da camada porosa de 1 μm , sendo produzidas a partir da pulverização de uma suspensão de partículas de sílica sólida em uma solução aquosa de sílica no estado sol. Porém, esse método de preparação apresentou a desvantagem de formar algumas partículas totalmente porosas que não poderiam ser separadas efetivamente das superficialmente porosas de mesmo tamanho. De modo a contornar esse problema, Kirkland e colaboradores utilizaram dois métodos diferentes para a produção de partículas de núcleo fundido: formação de multicamadas e coalescência de partículas. A partir desses métodos foi possível formar partículas com diferentes diâmetros (3-

6 μm), tamanhos de poro (0,9-8 μm) e espessura da camada porosa (0,25-1 μm) (KIRKLAND, 1992; KIRKLAND *et al.*, 2000).

O maior destaque na produção de partículas de núcleo fundido foi a introdução das partículas de terceira geração desenvolvidas por Kirkland e colaboradores em 2007, chamadas Halo (Advanced Material Technologies). Essas partículas apresentam 2,7 μm de diâmetro total, 0,9 μm de espessura de camada porosa e tamanho de poro de 9 nm. Sua produção é iniciada com a formação de partículas de sílica sólidas a partir do controle de crescimento, seguida da adição de um surfactante adsorvente para a formação da camada porosa externa juntamente com um processo de alargamento dos poros. Esse tipo de processo gera uma distribuição muito pequena no tamanho das partículas e uma elevada densidade, características importantes na preparação de leitos cromatográficos homogêneos e com alta eficiência. Devido à menor espessura da camada porosa, exibem elevada taxa de transferência de massa permitindo uma rápida difusão do soluto pela fase estacionária. Essas características favorecem o uso dessas partículas de núcleo fundido em rápidas separações utilizando equipamentos convencionais, visto que não há aumento significativo da pressão total do sistema (KIRKLAND *et al.*, 2007; DESTEFANO *et al.*, 2007; GUIOCHON e GRITTI, 2011).

2.6 Diabetes mellitus

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e com a American Diabetes Association, está ocorrendo uma epidemia de DM no mundo. Estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 382 milhões de pessoas, com projeção de chegar a 471 milhões em 2035. O número de indivíduos aumenta devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, assim como a maior sobrevivência de pacientes com DM. A DM não deve ser considerada uma doença única, mas sim um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, principalmente a hiperglicemia crônica (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015; American Diabetes Association, 2015).

A classificação atual subdivide a DM em DM1 e DM2, outros tipos específicos (incluem-se defeitos genéticos e doenças pancreáticas) e diabetes gestacional. O DM1 é uma doença autoimune em que há um distúrbio catabólico que leva à destruição das células β do pâncreas. Isso gera uma consequente ausência de insulina, sendo necessária a aplicação de insulina exógena como tratamento. Já a DM2 caracteriza-se por defeitos na ação, devido à insensibilidade periférica à insulina, e na secreção de insulina pelas células β do pâncreas, porém sem a sua destruição pelo sistema imunológico (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015; American Diabetes Association, 2013).

O DM2 está frequentemente associado à hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias e outras afecções cardiovasculares e representa cerca de 90 a 95% dos casos de diabetes. Os programas de prevenção primária se baseiam em intervenções nutricionais e na prática de atividade física, porém, quando o paciente não responde ou deixa de responder as medidas não medicamentosas, é realizado o tratamento medicamentoso com antidiabéticos orais (BRASIL, 2015; American Diabetes Association, 2013).

Os antidiabéticos orais (**Tabela 3**) são substâncias que tem a finalidade de reduzir a glicemia e mantê-la em valores normais, sendo < 100 mg/dL em jejum e < 140 mg/dL no período pós-prandial. Eles podem ser classificados em quatro categorias de acordo com sua ação sobre a secreção de insulina: os que aumentam (hipoglicemiantes ou secretagogos), os que não aumentam (anti-hiperglicemiantes), os que aumentam de forma dependente da glicose e os que promovem glicosúria, sem relação com a secreção de insulina (BRASIL, 2014, 2015).

De acordo com o algoritmo de tratamento da DM2, na sua primeira fase, caracterizada por uma hiperglicemia discreta, a melhor indicação são os medicamentos que não aumentam a secreção de insulina, sendo a metformina o medicamento de escolha. Com a diminuição da secreção de insulina na segunda fase, indica-se uma terapia combinada da metformina com um secretagogo, sulfonilureias ou metiglinidas. A escolha do segundo antidiabético irá depender da ação hipoglicemiante necessária, sendo que as sulfonilureias possuem uma ação mais prolongada durante todo o dia, enquanto as

metiglinidas apresentam um menor tempo de ação, cobrindo principalmente o período pós-prandial (BRASIL, 2014, 2015).

Tabela 3 – Fármacos antidiabéticos orais e seus mecanismos de ação.

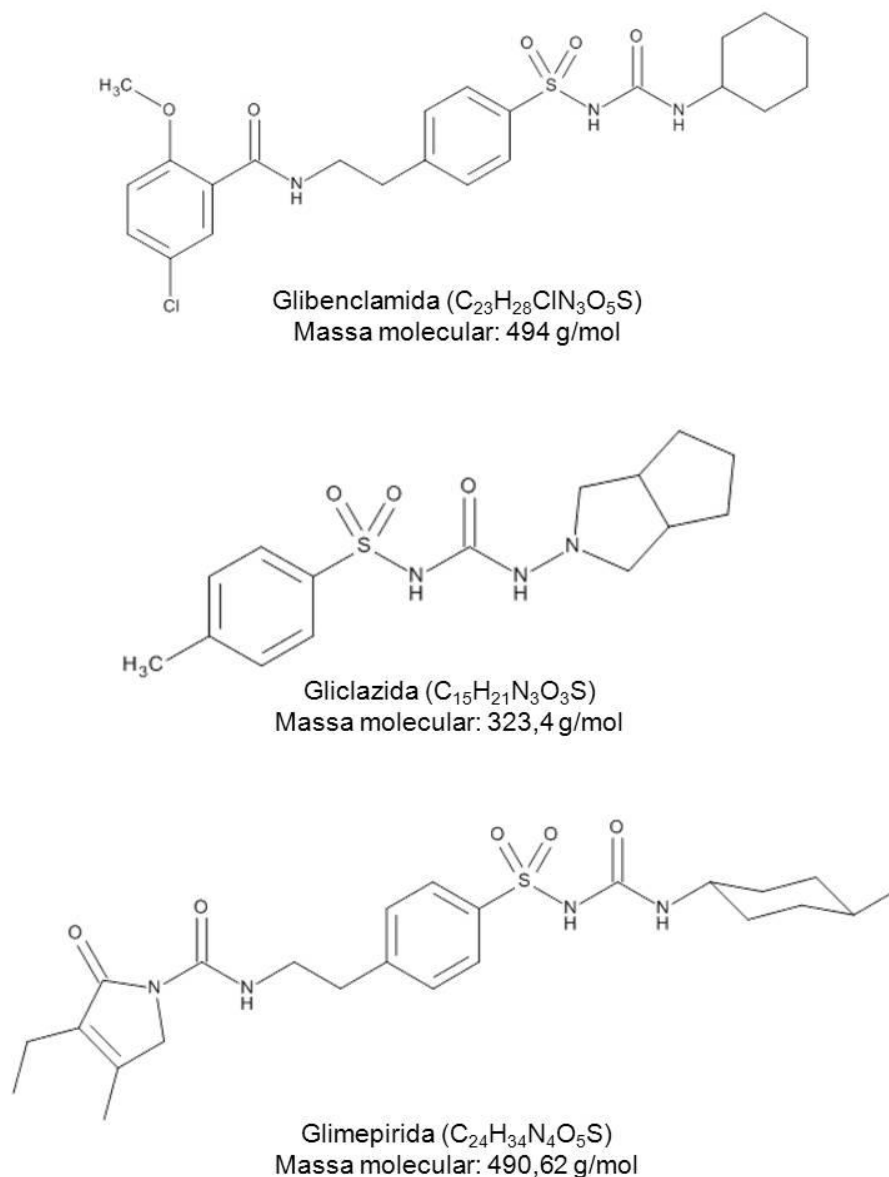
Classe	Medicamentos	Mecanismo de ação
Sulfonilureias	Clorpropamida	Aumento da secreção pancreática de insulina
	Glibenclamida	
	Gliclazida	
	Glimepirida	
Metiglinidas	Repaglinida Nateglinida	
Biguanidas	Metformina	Redução da produção hepática de glicose
Inibidores da α -glicosidase	Acarbose	Retardo da absorção de carboidratos
Glitazonas	Pioglitazona	Aumento da sensibilidade à insulina
Inibidores da DPP-IV	Sitagliptina	Aumento do nível de GLP-1, com aumento da síntese de insulina/redução do glucagon
	Vildagliptina	
	Saxagliptina	
	Linagliptina	
Inibidores da SGLT ₂	Dapagliflozina	Inibidor de SGLT2 em túbulo proximal renal
	Empagliflozina	
	Canagliflozina	

Legenda: DPP-IV = dipeptidil peptidase IV; SGLT2 = cotransportador sódio-glicose tipo 2, do inglês *sodium glucose cotransport type 2*.

2.7 Sulfonilureias

As sulfonilureias são compostos que diferem entre si por substituições na posição *para* do anel benzeno e em um resíduo de nitrogênio do componente ureia. Podem ser subdivididas em primeira geração: clorpropamida (CL), tolazamida e tolbutamida (TB); e segunda geração (mais potentes): glibenclamida (GB) (também chamada de gliburida), glipizida (GP), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) (**Figura 15**) (GOODMAN e GILMAN, 2012; RAMALHO e LIMA, 2006).

Figura 15 – Estruturas das sulfonilureias analisadas (GB, GZ e GM) com suas respectivas fórmulas e massas moleculares.



Essa classe de compostos age estimulando a liberação de insulina por meio da ligação a um sítio específico no complexo do canal de K_{ATP} das células β pancreáticas, inibindo sua atividade. Essa inibição causa a despolarização da membrana celular, inibindo o fluxo de íons K⁺ pelo canal, provocando a despolarização da membrana da célula, o que leva a abertura dos canais de cálcio. Com o influxo de cálcio para dentro da célula, sua concentração citosólica aumenta, favorecendo a secreção hormonal a partir dos grânulos de insulina. Em geral, as sulfonilureias possuem uma absorção razoavelmente rápida e completa pelo trato gastrointestinal. No plasma estão ligadas às proteínas

plasmáticas, principalmente à albumina, cerca de 90-99%. São metabolizadas no fígado e seus metabólitos são excretados na urina (GOODMAN, 2012; RAMALHO E LIMA, 2006).

As propriedades físico-químicas da GB, GM e GZ são semelhantes entre si, sendo que todas possuem um valor de pKa próximo a 5,0 (GB 5,3, GM 4,3 e GZ 5,8). São mais solúveis em solventes apolares e pouco solúveis em água, com exceção da GB que é considerada moderadamente solúvel em água. Elas possuem valores de coeficiente de partição octanol/água relativamente altos: $\log P_{GB} = 4,7$, $\log P_{GM} = 3,5$ e $\log P_{GZ} = 2,6$. Conseqüentemente, são consideradas moléculas apolares, tendo maior afinidade por sorventes de cromatografia em fase reversa. Seus espectros de absorção em ultravioleta (UV) também são semelhantes, sendo observado pico de absorção na faixa UV próximo a 230 nm para GB, GM e GZ (TROY, 2005; MOFFAT *et al.*, 2004; O'NEIL *et al.*, 2006; DRUG BANK, 2015).

Com exceção da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, as propriedades farmacocinéticas desses três compostos são diferentes. Suas dosagens diárias variam de 4 mg até 320 mg e a duração da ação varia de 12 a 24 horas. A concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) observada para GB e GM são inferiores àquela observada para GZ quando doses usuais dos fármacos são administradas. Pistos e colaboradores relataram uma $C_{máx}$ de 241,45 ng mL⁻¹ em um tempo máximo ($t_{máx}$) de 2,92 horas para a GM após a administração de um comprimido de 4 mg. Resultado relativamente próximo ao obtido por Malerczyk e colaboradores, onde a administração de 4 mg de GM leva a uma $C_{máx}$ de 307,8 ± 69,4 ng mL⁻¹ em um $t_{máx}$ de 2,1 ± 0,6 h (MOFFAT *et al.*, 2004; TROY, 2005; PISTOS *et al.*, 2005; MALERCZYK *et al.*, 1994).

Para a GB, os trabalhos desenvolvidos por Niopas, Khatri e Mistri, relataram valores de $C_{máx}$ semelhantes após a administração de 5 mg do fármaco: 167,7; 175,9 e 170 ng mL⁻¹, respectivamente. Porém, foram observadas diferenças nos valores de $t_{máx}$ obtidos por essas fontes: 3,6; 3,25 e 5 h, respectivamente (NIOPAS e DAFTSIOS, 2002; KHATRI *et al.*, 2001; MISTRI *et al.*, 2007).

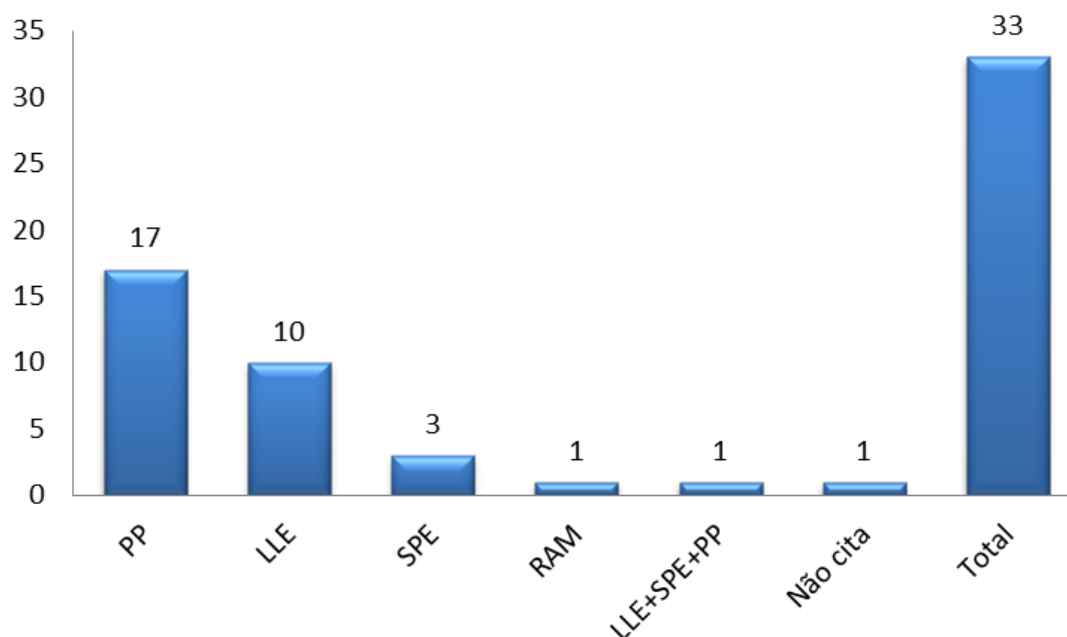
A dose administrada de GZ (80 mg) é maior do que as doses dos demais compostos acima citados, desse modo, é possível observar valores de $C_{máx}$ mais

elevados em $t_{m\acute{a}x}$ semelhantes aos obtidos para GB e GM. Em 2003, Kim e colaboradores administraram 80 mg de GZ em indivídúos coreanos e europeus, obtendo valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 4690 e 4560 ng mL⁻¹ e valores de $t_{m\acute{a}x}$ de 3,45 e 4,10 horas, respectivamente. Foroutan e colaboradores relataram em 2005, um valor de $C_{m\acute{a}x}$ de 2686,2 ng mL⁻¹ após a administração de 80 mg de GLZ, em um $t_{m\acute{a}x}$ de 3,5 horas. Em 1981, Kobayashi e colaboradores realizaram um estudo a partir da administração de 80 mg de GZ em indivídúos diabéticos, neste caso a média dos valores de $C_{m\acute{a}x}$ obtida foi maior que os valores relatados por Kim e Fouroutan, sendo de 6800 ± 1200 em um $t_{m\acute{a}x}$ de $2,3 \pm 1,7$ h (KIM, 2003 *et al.*; FOROUTAN *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 1981).

2.8 Determinação de sulfonilureias em plasma humano

Na literatura podem ser encontrados muitos estudos referentes ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa das sulfonilureias em plasma humano, utilizando CLAE. Dentre os trabalhos avaliados (**Tabela 4**), praticamente todos utilizavam técnicas convencionais (PP, LLE e SPE convencional) durante o preparo de amostra, com exceção do trabalho desenvolvido por Song e colaboradores em 2004 e dos estudos realizados em nosso laboratório de pesquisa, por Viana e colaboradores e Souza e colaboradores, ambos em 2014 (**Figura 16**) (SONG *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2014).

Figura 16 – Número de trabalhos encontrados na literatura que tratam da determinação de sulfonilureias em plasma humano, classificados de acordo com a técnica de preparo de amostras utilizada.



Song e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de GM em plasma humano utilizando 3 colunas em um sistema CLAE no modo *column-switching*. Inicialmente, a amostra de plasma foi pré-separada durante 7,1 minutos em uma pré-coluna CapCell Pak MF Ph-1 (10 x 4,0 mm), que é um tipo de coluna RAM com fase funcional mista, para remoção das proteínas e concentração do analito. Nesta etapa foi utilizada como fase móvel um mistura de acetonitrila e tampão fosfato de potássio 10 mM contendo 0,04% de trietilamina (20:80, v/v, pH 2,18). Em seguida, as frações do analito foram transferidas durante 8 minutos para uma coluna intermediária CapCell Pak UG C18 (35 x 2 mm) de maneira a proteger a coluna analítica principal, diminuir o tempo de análise e obter picos mais bem definidos no final da separação. Passado este tempo, os analitos foram transferidos para uma coluna Capcell Pak MG C18 (250 x 1,5 mm, 5 μ m) para separação final utilizando a mesma fase móvel inicial, mas em proporção diferente (52:48, v/v, pH 2,18). O tempo total gasto para a determinação da GM foi de 40 minutos. A faixa de linearidade obtida para o método validado foi de 10 à 400 ng mL⁻¹ e o limite de quantificação inferior (LIQ) foi de 10 ng mL⁻¹ (SONG *et al.*, 2004).

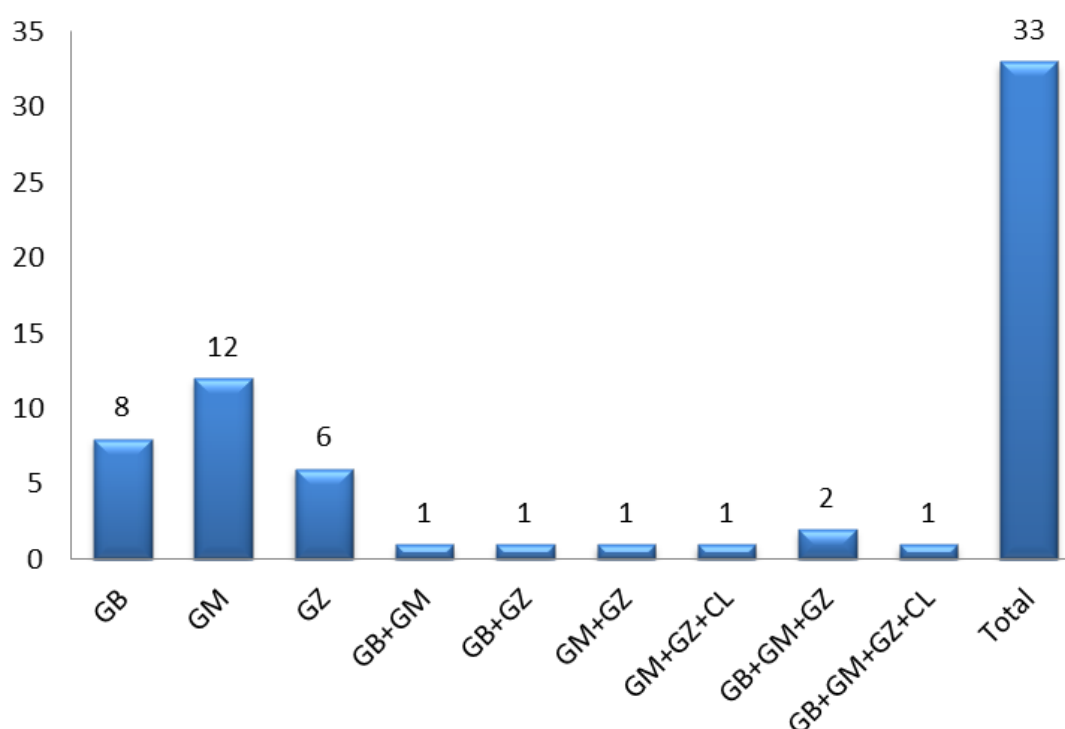
Em 2014, Viana e colaboradores desenvolveram e validaram um método analítico por CLAE, para a determinação simultânea de clorpropamida (CL), GM e GZ em plasma humano, utilizando na etapa de preparo de amostras a técnica MEPS. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de núcleo fundido C18 (10 x 4,6 mm; 2,6 μm), fase móvel composta por acetonitrila e solução de fosfato de potássio 10 mM pH 3,0 (60:40 v/v) com vazão de 1,0 mLmin⁻¹, volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de detecção de 230 nm. Para o preparo de amostras utilizando MEPS foram realizados 10 ciclos de injeção/aspiração da amostra no sorvente MEPS (100 μL), seguidos de 4 ciclos com água no mesmo volume para remoção dos interferentes. Ao final dos ciclos, os analitos foram desorvidos do suporte pela passagem de 70% de acetonitrila em água (3 ciclos de 50 μL). As faixas de linearidade obtidas para o método validado foram de 1000 a 50000 ng mL⁻¹ para CL, 1000 a 10000 ng mL⁻¹ para GZ e 100 a 1000 ng mL⁻¹ para GM. Os LIQs obtidos foram 1000, 1000 e 100 ng mL⁻¹, respectivamente (VIANA *et al.*, 2014).

Um método para análise por CLAE de quatro sulfonilureias, CL, GB, GM e GZ, em plasma humano foi desenvolvido por Souza e colaboradores utilizando como técnica de preparo de amostras extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid-phase extraction*). A extração foi realizada a partir do contato da amostra biológica com nanopartículas magnéticas inseridas em sílica mesoporosa. Desse modo, os analitos ficaram sorvidos na sílica, enquanto os interferentes permaneceram livres, sendo descartados. Os analitos foram então desorvidos utilizando um solvente orgânico e, em seguida, injetados em um cromatógrafo a líquido. As condições cromatográficas utilizadas para a análise das sulfonilureias foram: coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 μm) a 30°C, fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato de potássio 10 mM pH 3,0 (55:45 v/v), com vazão de 1,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 μL e comprimento de onda de detecção de 230 nm (SOUZA *et al.*, 2014).

Dentre os trabalhos analisados, quatro relataram determinação simultânea dos três fármacos analisados neste estudo (GB, GM e GZ): AbuRuz *et al* em 2005, Maurer *et al* em 2002, Viana *et al* em 2014 e Souza *et al* também em 2014 (**Figura 17**). Porém, a determinação não foi simultânea para o estudo realizado por AbuRuz e colaboradores, sendo desenvolvidos dois métodos que diferiam

apenas no pH utilizado na fase móvel durante a separação: pH 7,3 para a determinação de metformina (MET), GB e GM; pH 5,3 para a determinação de MET, GP e GZ (ABURUZ *et al.*, 2005; MAURER *et al.*, 2002; VIANA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014).

Figura 17 – Número de trabalhos encontrados na literatura que tratam da determinação de sulfonilureias em plasma humano, classificados de acordo com as sulfonilureias analisadas.



A maioria dos trabalhos analisados fez a adição de um padrão interno em suas amostras biológicas, sendo que entre eles é possível observar uma grande variação entre as classes e aplicações às quais esses compostos pertencem. As sulfonilureias foram as mais utilizadas, incluindo: gliquidona, TB, GB (o padrão interno mais recorrente), GZ, GM e GP. Dentre os demais padrões internos citados nos trabalhos avaliados estão presentes: 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina, ácido flufenâmico, carbamazepina, celecoxibe, cetoconazol, fenformina, fenitoína, flurbiprofeno, huperzina A, metil 4-hidroxibenzoato, nicadipina e trimipamina-D3. Apenas quatro trabalhos não informaram o uso de padrões internos.

Tabela 4 – Trabalhos descritos na literatura que tratam do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa de sulfonilureias (GB, GM e GZ) em plasma humano, utilizando CLAE.

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GB GM GZ CL	SPE (MSPE)	NA	Acetonitrila e solução fosfato de potássio 10 mM pH 3,0	CLAE-UV	18,80 ± 0,09 (GB) 47,36 ± 0,81 (GM) 3,13 ± 0,00 (GZ) 4,51 ± 0,31 (CL)	NA	Souza <i>et al.</i> 2014
GM GZ CL	SPE (MEPS)	1000 - 50000 (CL) 1000 - 10000 (GZ) 100 - 1000 (GM)	Acetonitrila e solução fosfato de potássio 10 mM pH 3,0	CLAE-UV	71,9/50,6/49,3% (GM) ^a 59,4/50,2/52,6% (GZ) ^a 45,8/37,2/46,7% (CL) ^a	1000 (CL) 1000 (GZ) 100 (GM)	Viana <i>et al.</i> 2014
GM MET PIO	NA	10 – 10000	tampão fosfato pH 4,3 e acetonitrila	CLAE-UV	99,95% (MET) 100,72% (PIO) 99,47% (GM)	0,5 (MET) 0,8 (PIO) 0,3 (GM)	Siddiqui <i>et al.</i> 2013
GM MET ATO	PP	0,50 - 150,03 (ATO) 12,14 - 1207,50 (MET) 4,98 - 494,29 (GM)	acetato de amônio 10 mM pH 3,0 e acetonitrila	CLAE - MS/MS	96,72 ± 0,88% (ATO) 72,88 ± 2,18% (MET) 74,16 ± 2,26% (GM)	0,5 (ATO) 12,25 (MET) 4,97 (GM)	Polagani <i>et al.</i> 2013

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GM GZ	PP	500 - 7500 (GM) 150 - 5000 (GZ)	metanol e água pH 3,5	CLAE-UV	101,45/102,36/ 102,11% (GM) 100,32/99,52/ 99,45% (GZ)	141 (GM) 46 (GZ)	Sultana <i>et al.</i> 2012
GM ROS	PP	100 - 25000 (ROS) 125 - 12500 (GM)	tampão fosfato 0,02M pH 5,0 e acetonitrila	CLAE-UV	97,19 ± 2,05% (ROS) 93,86 ± 2,04 (GM)	130 (ROS) 110 (GM)	El-Enany <i>et al.</i> 2012
GB GM GP PIO ROS	PP	100 – 100000	triethylamina 0,05% pH 3,5, acetonitrila e metanol	CLAE-UV	NA	100	Lakshmi <i>et al.</i> 2011
GZ MET	PP	6.0 - 3550 (MET) 7.5 - 7500 (GZ)	acetonitrila e água	SFC-MS/MS	95/98/102% (MET) 93/96/93% (GZ)	6 (MET) 7,5 (GZ)	Agrawal <i>et al.</i> 2010

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GZ MET	PP	50 – 5000	acetonitrila e metanol e dodecilsulfato de sódio 5 mM pH 3,5 85%	CLAE-DAD	NA	50 (MET) 49 (GZ)	Ranetti <i>et al.</i> 2009
GZ	PP	50 – 10000	acetonitrila, metanol e água pH 3	CLAE-UV	85,50%	50	Ghai e Ganesh. 2009
GB ATE ROV SPI NAP	PP	250 – 30000	metanol e água pH 3,4	CLAE-UV	NA	60	Sultana <i>et al.</i> 2008
GM	LLE	0,02 – 100	tampão acetato de amônio 0,01 M , acetonitrila e metanol	CLAE - MS/MS	87,32/83,71/84,02%	0,02	Chakradhar <i>et al.</i> 2008

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GM	LLE	5 – 1000	água, acetonitrila e metanol e 0,6 mL de ácido acético glacial	CLAE - MS/MS	88,70%	5	Yüzüak <i>et al.</i> 2007
GB	LLE	50 – 400	acetato de amônio 50 mM pH 5,4 e acetonitrila	CLAE - MS/MS	71,5/71,9/77,7/ 81,2/76,3%	16,7	Gedeon <i>et al.</i> 2007
GB	PP	1- 500	sol.aq. HCOOH 0,1% e acetonitrila	CLAE - MS/MS	98,1 ± 2,8%	1,5	Albu <i>et al.</i> 2007
GB MET	PP	50 - 2000 (MET) 5 - 400 (GB)	acetato de amônio 0,01 M pH 3,5 e acetonitrila	CLAE - MS/MS	NA	40 (MET) 4 (GB)	Georgita <i>et al.</i> 2007

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GB MET	PP	20 - 2500 (MET) 5 - 500 (GB)	acetato de amônio 5 mM pH 3,0 e acetonitrila	CLAE - MS/MS	69,3 % (MET) 71,2% (GB)	20 (MET) 5 (GB)	Mistri <i>et al.</i> 2007
GB GZ GP PIO REP ROS	PP	100 - 100000 (-GB) 300 - 100000 (GB)	ácido fórmico 0,01M pH 3,0; acetonitrila e água/ água e metanol (gradiente)	CLAE-UV	92,37 - 106,50%	100 (-GB) 300 (GB)	Venkatesh, 2006
GM	LLE	10 – 1000	ácido acético glacial 0,1 mM pH 2,5-2,7 e acetonitrila	CLAE-DAD	85,6/84,7/82,4/85,5/81,8/ 84,5/84,3/85,6%	10	Rabbaa-Khabbaz, 2005
GM	LLE	2,0 – 500	ácido acético 20 mM e acetonitrila	CLAE - MS/MS	18,8/54,4/22,7%	2	Dotsikas <i>et al.</i> 2005

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GB GM GZ GP MET	SPE	100 - 1500 (MET) 20-750 (GB/GM/GP) 100-1500 (GZ)	dodecilsulfato de sódio 2 mM, acetonitrila e dihidrogênio fosfato de potássio: pH 7,3 para MET ₁ /GB/GM e pH 5,3 para MET ₂ /GP/GZ	CLAE-UV	85% (MET ₁) 93,6% (MET ₂) 85% (GB) 99,3% (GM) 83,3% (GP) 93,23% (GZ)	5 (MET ₁) 16,5 (MET ₂) 7 (GB) 7,5 (GM) 7,5 (GP) 22,5 (GZ)	AbuRuz <i>et al.</i> 2005
GM	LLE	0,5 – 1000	ácido fórmico 0,05M e acetonitrila	CLAE - MS/MS	95,6 ± 5,6%	0,5	Pistos <i>et al.</i> 2005
GZ	PP	50-4000 nM*	tetraborato disódico 70 mM pH 7,5 e acetonitrila	CLAE - ED	99,12%	50 nM*	Kuo <i>et al.</i> 2005
GZ MET	PP	7,8 - 4678,9 (MET) 10 -10000 (GZ)	metanol, ácido fórmico 1% e acetonitrila	CLAE - MS/MS	71,0 - 83,6 % (MET) 88,1 - 104,0% (GZ)	7,8 (MET) 10 (GZ)	Zhong <i>et al.</i> 2005

Tabela (Continuação)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GZ	PP	10-50000	tampão hidrogênio fosfato disódico 0,01M e acetonitrila pH 4,0	CLAE-UV	93-96,9%	10	Foroutan <i>et al.</i> 2005
GM	LLE	5 – 500	tampão acetato de amônio 0,02 M pH 3,5, acetonitrila e metanol	CLAE-MS/MS	86,36 - 91,99%	5	Salem <i>et al.</i> 2005
GM	SPE (RAM) <i>column-switching</i>	10 – 400	tampão fosfato 10 mM e acetonitrila	CLAE-UV	NA	10	Song <i>et al.</i> 2004
GM	LLE SPE PP	0,1 – 500	água pH 3,5 e acetonitrila	CLAE - MS/MS	75,5 % (LLE) 85,5% (SPE) 98,1% (PP)	0,1 (LLE) 0,5 (SPE) 1,0 (PP)	Kim <i>et al.</i> 2004
GM	LLE	0,1 – 200	acetato de amônio 5mM e acetonitrila pH 3,0	CLAE - MS/MS	79,8/73,4/71,2/ 75,3/76,8/77,1%	0,1	Kim <i>et al.</i> 2004

Tabela (Conclusão)

Analitos	Preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Fase móvel	Método analítico	Recuperação (%)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
GB	PP	1-400	acetato de amônio 10 Mm, acetonitrila, ácido acético e trifluoro acético	CLAE - MS/MS	91,5 - 106%	1	Chen et al. 2004
GB GZ GM	LLE	10000-200000(GB) 500000-6000000(GZ) 100000-3000000(GM)	formiato de amônio e acetonitrila (gradiente)	CLAE - MS/MS	79/100,1% (GB) 69,2/67,8% (GZ) 76,2/76,4% (GM)	10000(GB) 500000(GZ) 100000(GM)	Maurer et al. 2002
GB	LLE	10-400	ácido acético, água e acetonitrila	CLAE-UV	91,50/93,7/93,8%	10	Niopas et al. 2002
GB	PP	5 – 400	tampão fosfato de amônio 0,05M, acetonitrila e metanol pH 5,7	CLAE-FLR	94,32/97,53/ 98,12/97,18%	5	Khatri et al. 2001

Legenda: PIO = pioglitazona; ATO = atorvastatina; MS = espectrometria de massas; ROS = rosiglitazona; SFC = cromatografia de fluido supercrítico; DAD = detector de arranjo de diodos; ATE = atenolol; ROV = rosuvastatina; SPI = espirolactona; NAP = naproxeno sódico; REP = repaglinida; NA = não se aplica; ED = detecção eletroquímica. ^aValores de recuperação obtidos para os controles de qualidade baixo, médio e alto, respectivamente.

2.9 Validação de métodos bioanalíticos

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos no Brasil. Outras fontes muito utilizadas são os Guias de Validação de Métodos Bioanalíticos do *Food and Drug Administration (FDA) – Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013 e da *European Medicines Agency (EMA) – Guideline on Bioanalytical Method Validation*, 2011. Estes guias fornecem recomendações gerais para a validação de métodos bioanalíticos que podem ser ajustadas ou modificadas dependendo do método analítico utilizado (BRASIL, 2012; FDA, 2001; EMA, 2011).

De acordo com esta resolução, os métodos cromatográficos são considerados de primeira escolha para a análise de moléculas, no entanto, só poderão ser implementados após sua validação total, que deverá conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, recuperação, efeito matriz, seletividade e estabilidade. A RDC n.º27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA, permite o ajuste ou modificação destes ensaios quando forem utilizadas técnicas alternativas, porém essas alterações devem ser mantidas o mais próximo possível dos ensaios fundamentados na resolução. Durante o processo de validação devem ser utilizadas substâncias químicas de referência (SQR), além disso, o uso do padrão interno (PI) deve ser feito sempre que for aplicável ao caso.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver método analítico para a determinação qualitativa e quantitativa das sulfonilureias glibenclamida, gliclazida e glimepirida em plasma humano empregando cromatografia a líquido bidimensional com coluna com meio de acesso restrito e coluna com partículas de núcleo fundido.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência da coluna RAM-ADS para exclusão de proteínas do plasma humano.
- Desenvolver método analítico para quantificação de sulfonilureias em plasma humano, por meio do emprego de CLAE bidimensional com fase RAM-ADS e com coluna com partículas de núcleo fundido.
- Otimizar as condições de composição e vazão da fase móvel, volume de injeção, tempo de exclusão proteica, tempo de extração dos analitos, temperatura, comprimento de onda na região do ultravioleta e padrão interno.
- Avaliar a influência da utilização de uma etapa prévia de precipitação proteica na etapa de preparo de amostras.
- Comparar os modos de eluição *backflush* e *foreflush*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQ) e no laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.1 Materiais

4.1.1 Insumos

- Glibenclamida insumo farmacêutico ativo doado pela Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Cadila Pharmaceuticals (Ahmedabad, Gujarat, India), lote 0GLL009, pureza 99,50%.
- Gliclazida insumo farmacêutico ativo doado pela CIFARMA (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Shandong Keyuas Pharmaceutical (Jinan, Shandong, China), lote 0809130, pureza 99,10%.
- Glimepirida insumo farmacêutico ativo doado pela CIFARMA (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Mantena Laboratories (Naldonga, Dist, Andhra Pradesh, India), lote GD/021/11/2011, pureza 99,96%.
- Ácido flufenâmico insumo farmacêutico ativo (Sigma-Aldrich – Steinheim, Alemanha), lote 057K1257.
- Glibenclamida substância química de referência (INCQS – Brasil), lote 1018.
- Gliclazida substância química de referência (INCQS – Brasil), lote 1057.
- Glimepirida substância química de referência (United States Pharmacopeia – EUA), lote G0K135.

4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila Panreac (Barcelona, Espanha) e metanol Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Solventes e reagentes grau analítico: ácido acético Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), ácido orto-fosfórico Merck (Darmstadt, Alemanha),

fosfato de potássio monobásico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e hidróxido de sódio Quimex (São Paulo, Brasil).

- Água ultrapurificada.
- Tubos Eppendorf.
- Pipetas, provetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, tubos de ensaio e kit de filtração a vácuo.

4.1.3 Equipamentos e materiais

- Aparelho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil) MaxiClean 1400.
- Balança analítica Shimadzu (Kyoto, Japão) AUW220D com precisão de 0,01 mg.
- Centrífuga Jouan (Saint-Herblain, França) MR23.
- Agitador de tubos MS1 Minishaker IKA (Staufen, Suíça).
- Coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 contendo partículas de núcleo fundido (100 x 4,6 mm, 2,7 μm) Agilent Technologies (Santa Clara, EUA).
- Pré-coluna C18 (4,0 mm x 3,0 mm) Phenomenex (Torrance, Estados Unidos da América).
- Coluna RAM-ADS Lichrocart 25-4 Lichrospher C18 ADS (25 x 4,0 mm, 25 μm) Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência composto de controladora SCL-10A VP, duas bombas LC-10AD VP, forno CTO-10A VP, injetor automático SIL-10AD VP, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A VP Shimadzu (Kyoto, Japão) e válvula de 6 vias e 2 posições VICI (Brockville, Canadá) Cheminert.
- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível Shimadzu (Kyoto, Japão) UV-1800.
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 μm Sartorius (Gotinga, Alemanha).
- Micropipeta 20-200 μL Finnipipette F3, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Estados Unidos da América).
- Micropipeta 1000 μL Pipetman, Gilson (Middleton, EUA).
- Freezer Revco (Garden Grove, EUA) com temperatura de -70°C .
- Potenciômetro Metrohm (São Paulo, Brasil) 827 pH Lab.

- Refrigerador GELOPAR (Araucária, Brasil) com temperatura de 2°C.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (Darmstadt, Alemanha) Direct-Q3.

4.1.4 Amostras biológicas

As amostras de plasma humano foram obtidas por meio de coleta de sangue de voluntários sadios realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG mediante aprovação do Comitê de ética da UFMG, protocolo CAAE número 01892012.0.0000.5149.

As coletas foram realizadas no período da manhã, com voluntários em jejum ou que realizaram um leve desjejum, caracterizado por alimentação pouco calórica e sem alimentos contendo café ou chocolate.

Todas as coletas foram realizadas utilizando tubos contendo heparina. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 480 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido (plasma) foi separado e armazenado a temperatura de -70°C até o seu uso.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo de soluções

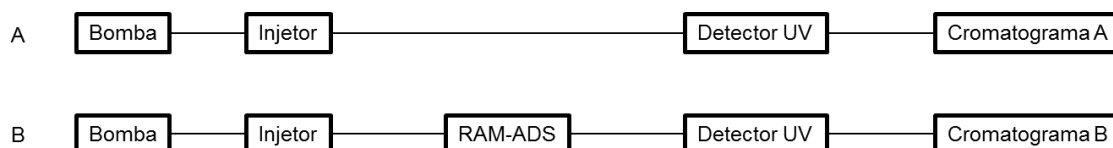
Soluções estoques de GB, GM e GZ na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ foram individualmente preparadas pela dissolução de 12,5 mg do fármaco em balão volumétrico de 25 mL empregando acetonitrila e água 4:1 (v/v) como diluente. Em seguida, 1 mL de cada solução estoque foi diluída em acetonitrila e água 50:50 (v/v) para obter uma solução de trabalho na concentração de 100 µg mL⁻¹. Após descongelamento, o plasma foi centrifugado a 10410 x g durante 5 minutos, fortificado utilizando as soluções estoque de 100 µg mL⁻¹, obtendo uma concentração final de 5 µg mL⁻¹ e, em seguida, agitado em vortex durante 30 segundos a 2200 rotações por minuto (rpm). As soluções estoque das sulfonilureias poderiam permanecer armazenadas a 4 °C por até 1 mês (VIANA *et al.*, 2014).

4.2.2 Avaliação da eficiência de exclusão das proteínas do plasma humano pela coluna RAM-ADS

Inicialmente, realizou-se injeção de volumes de plasma humano branco (20, 50, 100, 200 e 500 μL) em um sistema cromatográfico sem as colunas RAM e analítica, utilizando água como fase móvel a 1 mL min^{-1} (**Figura 18a**). Dessa forma, todo plasma injetado foi direcionado diretamente ao detector que operava a 280 nm, comprimento de onda relativo ao máximo de absorção das proteínas plasmáticas (NOBLE e BAILEY, 2009). Assim, foi possível obter-se os cromatogramas e as áreas sob os picos relativos às proteínas plasmáticas contidas nos padrões de plasma humano, correspondendo a 100% de concentração.

Em seguida, a coluna RAM-ADS foi adicionada ao sistema cromatográfico, ainda sem uma coluna analítica. Os mesmos volumes de plasma humano branco foram injetados nas mesmas condições (**Figura 18b**). Dessa forma, foram obtidas as áreas referentes às proteínas plasmáticas excluídas pela coluna RAM-ADS. Pela comparação das áreas dos picos do padrão de plasma branco (100%) com as áreas referentes às macromoléculas excluídas pela coluna, foi possível estabelecer as porcentagens de exclusão da coluna RAM para os volumes de injeção testados.

Figura 18 – Esquema da montagem do sistema cromatográfico para avaliação da exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS



4.2.3 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas

Para permitir que o preparo da amostra ocorresse diretamente no sistema cromatográfico (modo *online*) foi utilizado um sistema multidimensional, com

uma coluna RAM-ADS (C18; 25 x 4,0mm; 25 μ m) acoplada a uma coluna com partículas de núcleo fundido (C18; 100 x 4,6mm, 2,7 μ m) por meio de uma válvula de 6 vias e duas posições. De maneira a preservar a integridade da coluna analítica, foi acoplada a esta uma pré-coluna (C18; 4,0 x 3,0mm). As variáveis durante a otimização foram consideradas tanto para a primeira dimensão (fase de exclusão) quanto para a segunda dimensão (fase analítica).

Utilizou-se como ponto de partida o método desenvolvido em nosso laboratório por Viana e colaboradores em 2014 (VIANA *et al.*, 2014) para determinação simultânea de fármacos antidiabéticos orais, tendo como fase móvel acetonitrila e solução de fosfato de potássio 10 mM pH 3,0 (60:40 v/v), com vazão de 1,2 mL min⁻¹. O volume de injeção utilizado no método foi de 20 μ L e o comprimento de onda de detecção foi de 230 nm.

4.2.3.1 Determinação do tempo necessário para exclusão proteica

Inicialmente, foi determinado o tempo necessário para a exclusão das proteínas das amostras biológicas, ou seja, o tempo em que a válvula iria permanecer na posição 1 (evento 1 no software do equipamento). Para isso, foram analisados os cromatogramas obtidos durante a avaliação da eficiência de exclusão das proteínas do plasma humano pela coluna RAM-ADS e o tempo necessário para que essa exclusão ocorresse.

4.2.3.2 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima no UV

Em seguida, realizaram-se varreduras na região espectral de 190 a 800 nm das amostras das sulfonilureias GB, GM e GZ, para determinação do comprimento de onda de absorção máxima no UV a ser utilizado no detector. As soluções de análise foram preparadas pela dissolução de 50 mg do insumo farmacêutico ativo em 50 mL de metanol, seguido de ultra-som por 20 minutos. Uma alíquota de 10 mL da solução inicial foi diluída em 100 mL de metanol, resultando em uma solução final com concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

4.2.3.3 Determinação do tempo necessário para eluição dos analitos

A eluição dos analitos retidos na coluna RAM-ADS ocorre após a viragem da válvula, passando da posição 1 para a posição 2. O tempo em que a fase móvel analítica passa pela coluna RAM-ADS influencia na qualidade final da análise; em vista disso, testes foram realizados de maneira a determinar o tempo ótimo para essa extração. Primeiramente, testou-se a influência do retorno da válvula da posição 2 para a posição 1 (posição inicial), em comparação com a permanência desta sempre na posição 2 (sem viragem da válvula). Em seguida, foram testados os seguintes tempos para retorno da válvula para posição inicial: 30, 60, 90 e 120 segundos.

4.2.3.4 Determinação das fases móveis de exclusão e analítica

Em relação à fase móvel de exclusão, foram analisados diferentes valores de pH para a fase móvel: 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, obtidos através da adição de hidróxido de sódio e ácido orto-fosfórico em água, de maneira a otimizar a eliminação dos interferentes da amostra biológica. Já para escolha da fase móvel analítica que melhor se adequaria à amostra e ao sistema utilizado, foram testadas misturas de acetonitrila:ácido acético 1% e acetonitrila:tampão fosfato de potássio 10 mM pH 3,0, em diferentes proporções e vazões, em eluição isocrática e gradiente.

4.2.3.5 Determinação do volume de injeção

Foram realizados testes referentes ao volume de injeção da amostra a ser injetada no sistema cromatográfico visando aumentar a detectabilidade do método. Os volumes avaliados foram os mesmos utilizados no teste para eficiência da coluna RAM-ADS para exclusão proteica: 20, 50, 100, 200 e 500 μL . A avaliação foi realizada pela comparação das áreas e das alturas dos picos cromatográficos de cada analito.

4.2.4 Precipitação proteica

Com o intuito de avaliar a influência da técnica de preparo de amostras utilizada no resultado final da análise, as técnicas precipitação proteica e extração em fase sólida por coluna RAM foram comparadas. Além disso, também foi avaliado o resultado do emprego da precipitação de proteínas seguida de análise no sistema bidimensional.

Para o uso da precipitação proteica como técnica de preparo de amostras, o sistema cromatográfico foi montado em modo unidimensional, utilizando apenas a coluna analítica. Adicionou-se acetonitrila ao plasma branco e ao plasma fortificado na proporção 1:1 (v/v) em ambas as amostras (POLSON *et al.*, 2002), seguido de agitação em vortex durante 1 minuto e centrifugação a 10410 x *g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi então recolhido e filtrado, em filtro de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm, para ser injetado no diretamente no sistema.

Além de avaliar e comparar o emprego da precipitação de proteínas e do sistema column-switching com coluna RAM utilizados individualmente, estas duas técnicas foram empregadas sequencialmente. Para isso, amostras de plasma passaram inicialmente pela etapa de precipitação proteica e, em seguida, foram injetadas no sistema cromatográfico em modo bidimensional, ou seja, contendo a coluna RAM.

4.2.5 Backflush x foreflush

Após o desenvolvimento do método, este foi avaliado nos dois modos de configuração disponíveis para o sistema bidimensional: *backflush* e *foreflush*. Para a comparação de qual modo seria mais adequado para a análise simultânea das três sulfonilureias, foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas previamente otimizadas, diferindo somente na configuração do sistema com consequentes mudanças nas posições das tubulações e da válvula.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eficiência de exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS

Após a injeção de diferentes volumes (20, 50, 100, 200 e 500 μL) de amostras de plasma branco, no sistema cromatográfico sem as colunas RAM-ADS e analítica, foram obtidos os cromatogramas com as áreas dos picos correspondentes a 100% de concentração de proteínas plasmáticas para cada volume analisado. Em seguida, foram injetadas amostras de plasma branco nas mesmas condições, porém em um sistema cromatográfico unidimensional com a presença da coluna RAM-ADS. A partir dessas análises, foram obtidos cromatogramas com áreas dos picos correspondentes às proteínas plasmáticas que foram excluídas durante a passagem pela coluna RAM-ADS.

Empregando a equação abaixo, foram obtidos os valores de porcentagem de exclusão de proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS para cada volume injetado, a partir da comparação das áreas sob os picos dos cromatogramas (**Tabela 5**).

$$\text{exclusão\%} = \frac{\text{Área sob o pico}_{\text{com coluna RAM}} \times 100}{\text{Área sob o pico}_{\text{sem coluna RAM}}}$$

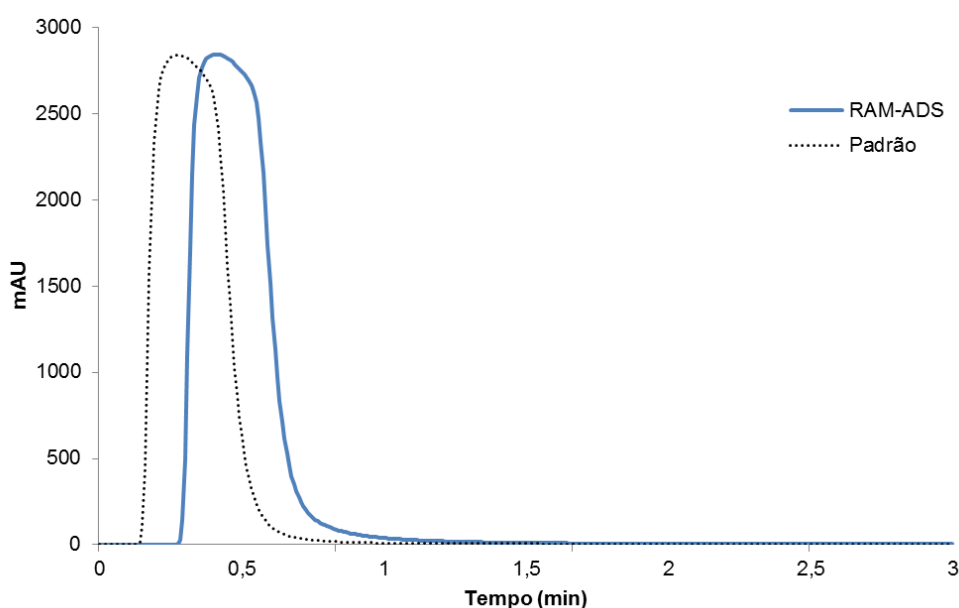
Como pode ser observado na **Tabela 5**, a média das porcentagens de exclusão de proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS, para os cinco volumes avaliados, foi de $104,5 \pm 2,25\%$. Esses valores foram considerados satisfatórios, indicando a exclusão total das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS, possibilitando seu uso como coluna de exclusão proteica para o preparo de amostras em métodos bioanalíticos empregando CLAE com injeção direta de matrizes biológicas.

Tabela 5 – Porcentagem de exclusão de proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS.

Volume de injeção (μL)	Área sob o pico		Exclusão (%)
	Sem coluna RAM	Com coluna RAM	
20	20509651	20674455	100,8
50	32340063	34123606	105,5
100	45236230	48327986	106,8
200	49928515	52410799	104,9
500	50935121	53198585	104,4
Média			104,5%
Desvio padrão			2,25

Na **Figura 19** estão apresentados os cromatogramas das proteínas plasmáticas eluídas através do sistema sem coluna (padrão) e das amostras excluídas pela coluna RAM-ADS no modo unidimensional. Os resultados foram obtidos empregando detector em 280 nm e água ultrapura como fase móvel de exclusão, na vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O cromatograma apresentado (**Figura 19**) refere-se ao ensaio realizado com volume de injeção de $200 \mu\text{L}$ de plasma humano, e é representativo daqueles obtidos com os outros volumes de injeção testados.

Figura 19 – Cromatogramas obtidos após eluição do plasma branco em sistema sem coluna e após exclusão em coluna RAM-ADS. Volume de amostra injetado: $200 \mu\text{L}$. Fase móvel: água ultrapura, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda de detecção: 280 nm.



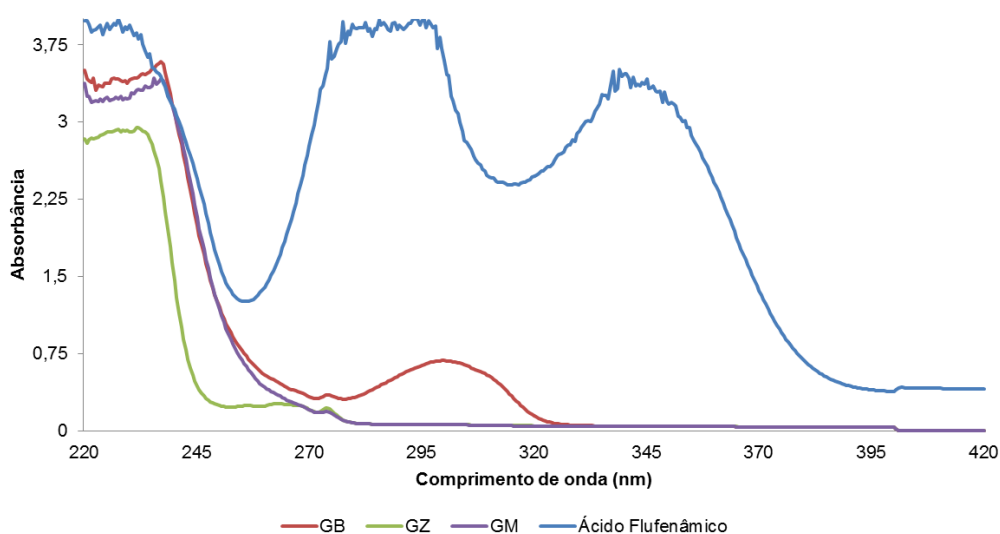
5.2 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas

Para otimização dos parâmetros e condições a serem utilizadas no método foram consideradas variáveis para as duas dimensões do sistema cromatográfico. Para a primeira dimensão foram avaliados os tempos necessários para exclusão proteica e para eluição dos analitos, além da determinação da condição da fase móvel de exclusão. Para a segunda dimensão foram avaliadas as seguintes variáveis: escolha do padrão interno, comprimento de onda de absorção máxima no UV, composição da fase móvel analítica e volume de injeção.

5.2.1 Comprimento de onda de absorção máxima no UV

Na **Figura 20** estão representados os espectros de absorção na região espectral de 220 a 420 nm, referentes a varredura de 190 a 800 nm para GB, GM e GZ. É possível observar a presença de um máximo de absorção em 230 nm para todas as sulfonilureias analisadas. Assim, este comprimento de onda foi selecionado para o monitoramento desses três fármacos.

Figura 20 – Espectros de absorção de soluções de GB, GM, GZ e ácido flufenâmico à $0,1 \text{ mgmL}^{-1}$ em metanol.



5.2.2 Escolha do padrão interno

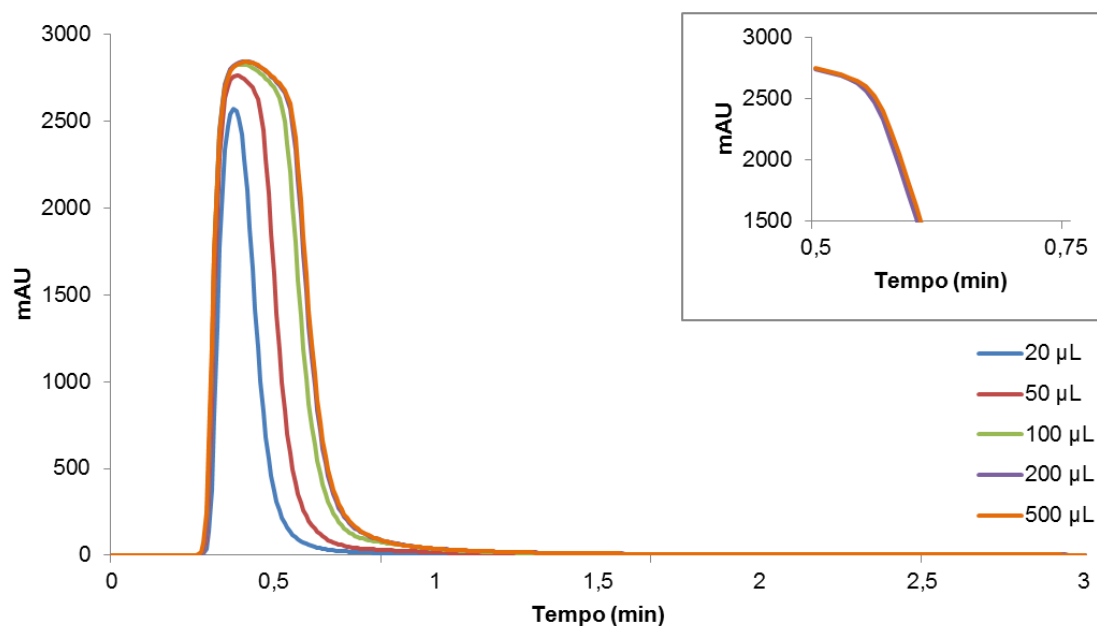
O padrão interno (PI) foi escolhido a partir da lista de padrões utilizados nos artigos encontrados durante a revisão da literatura, em função dos disponíveis em nosso laboratório. O objetivo foi selecionar um fármaco que apresentasse um tempo de retenção semelhante aos demais analitos, porém que não gerasse sobreposição de picos, além de apresentar máximo de absorção em 230 nm. Considerando estes requisitos, foi selecionado o ácido flufenâmico, que possui logP de 5,25 e pKa de 3,88, além de apresentar um máximo de absorção em 230 nm (**Figura 20**).

5.2.3 Tempo necessário para exclusão proteica

A partir dos cromatogramas obtidos durante a avaliação da eficiência de exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS, foi obtido o tempo necessário de passagem de fase móvel de exclusão (água ultrapura) através da coluna, de maneira a realizar 100% de exclusão proteica. Na **Figura 21** estão sobrepostos os cromatogramas das proteínas excluídas, obtidos a partir da injeção dos volumes 20, 50, 100, 200 e 500 μL de plasma humano, em sistema unidimensional. Em maior aumento é possível observar que os cromatogramas referentes aos volumes de 200 e 500 μL estão praticamente sobrepostos.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que após a passagem de fase móvel de exclusão pela coluna RAM-ADS, por 3 minutos, há exclusão de 100% das proteínas plasmáticas em todos os volumes avaliados. Desse modo, determinou-se que o tempo de viragem da válvula da posição 1 para a posição 2 seria de 3 minutos.

Figura 21 – Cromatogramas obtidos a partir da exclusão das proteínas plasmáticas pela coluna RAM-ADS. Volumes de injeção da amostra: 20, 50, 100, 200 e 500 μL . Fase móvel: água ultrapura, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda de detecção: 280 nm.

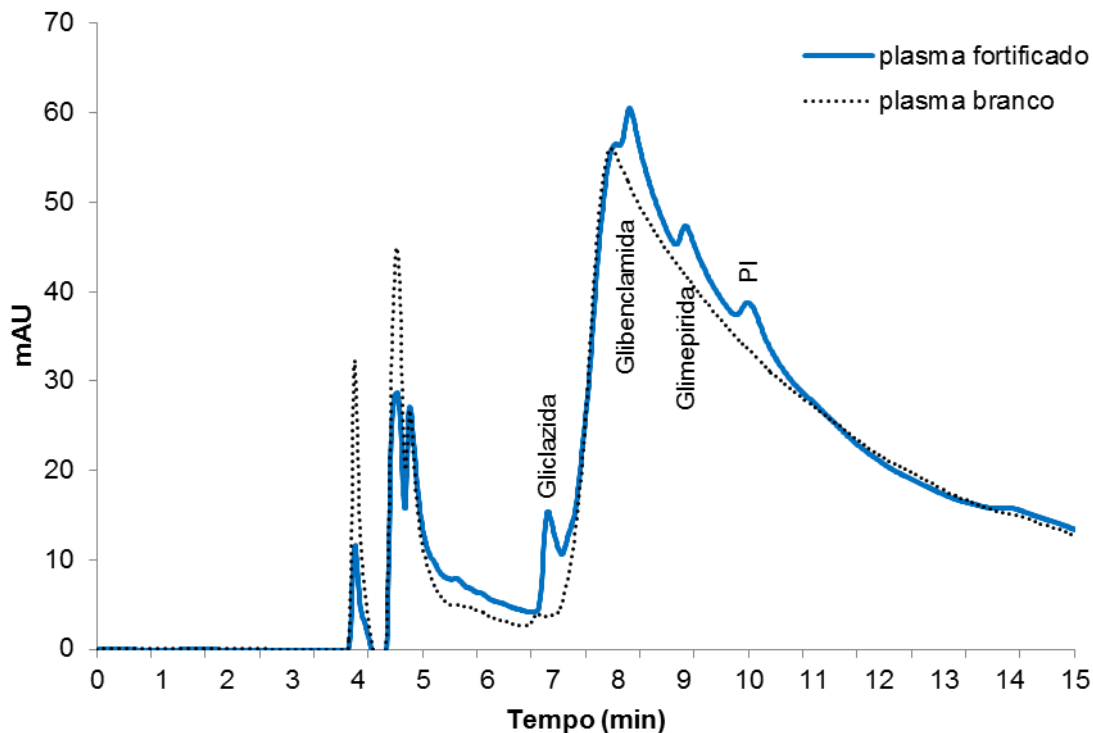


5.2.4 Tempo necessário para eluição dos analitos da coluna RAM-ADS

Para a avaliação da influência do retorno da válvula para sua posição inicial na intensidade do sinal analítico, realizou-se análise em que não houve retorno da posição 2 para a posição 1 ao final da exclusão proteica. Nesse modo, a fase móvel analítica percorre o caminho referente à coluna RAM-ADS e à coluna analítica durante todo o processo.

Na **Figura 22** estão apresentados os cromatogramas referentes às análises da amostra de plasma fortificado com GB, GM, GZ e PI e da amostra de plasma branco, sem o retorno da válvula para a posição inicial. É possível observar que a amostra de plasma branco apresenta um sinal referente à linha de base de grande intensidade, dificultando a integração do pico de cada analito e consequentemente impossibilitando sua análise.

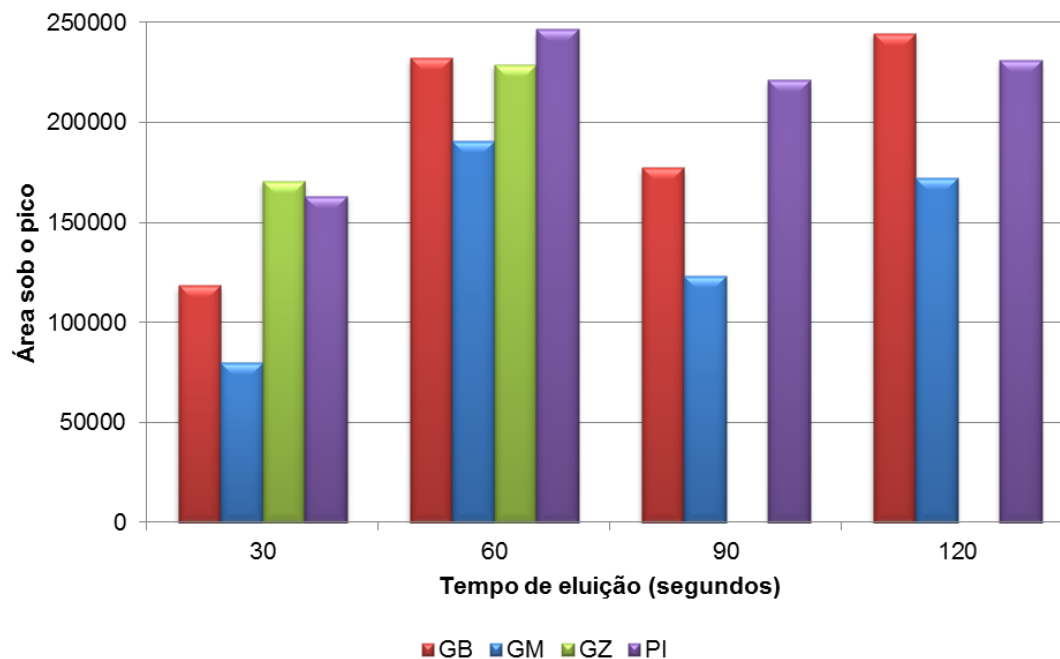
Figura 22 – Cromatogramas obtidos a partir da análise de plasma branco e fortificado, sem viragem de válvula. Volume de amostra injetado: 200 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda de detecção: 230 nm.



A partir da constatação da necessidade do retorno da válvula para a posição inicial (evento 1) após o término do período de eluição dos fármacos da coluna RAM-ADS para a coluna analítica, foram avaliados diferentes intervalos de tempo (30, 60, 90 e 120 segundos), de maneira a otimizar a eluição dos analitos retidos na coluna RAM-ADS.

No gráfico abaixo (**Figura 23**) estão representadas as áreas dos picos dos analitos e do PI obtidos nos cromatogramas de cada tempo de eluição avaliado. Não foi possível determinar a área dos picos da GZ nos cromatogramas referentes aos tempos 90 e 120 segundos, visto que há uma sobreposição do seu pico com um interferente do plasma. Este interferente apresenta-se com maiores valores de área nesses dois tempos de eluição.

Figura 23 – Áreas sob os picos de GB, GM, GZ e PI em função do tempo de viragem de válvula da posição A para a posição B.



Para os demais tempos de eluição avaliados, observa-se que, para todos os analitos e para o PI, há um aumento dos valores de área obtidos quando o tempo de viragem de válvula foi de 60 segundos, em relação ao de 30 segundos. Em vista desses resultados, foi definido que o tempo ótimo para eluição dos analitos da coluna RAM-ADS para a coluna analítica, ou seja, o tempo de viragem da válvula da posição 2 para a posição 1, seria de 60 segundos.

5.2.5 Fase móvel de exclusão

A fase móvel de exclusão utilizada no método foi a água ultrapura, que apresenta baixa afinidade tanto pelos analitos quanto pelo PI, garantindo uma maior interação dos analitos pela fase estacionária da coluna RAM-ADS, otimizando o processo de extração da matriz biológica. Além disso, a água tem a capacidade de ionizar as proteínas presentes na amostra, favorecendo sua exclusão proteica por repulsão eletrostática pela coluna RAM-ADS. Visando melhorar a eliminação dessas proteínas, foram analisados quatro valores de pH para a água: 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0. Os resultados obtidos estão representados nas figuras seguintes, com exceção do pH 7,0 em que não foi possível identificar nenhum dos picos do

cromatograma pela baixa resolução entre eles com, consequente, sobreposição dos picos dos analitos.

Como pode ser observado na **Figura 24**, os resultados obtidos para os três pHs foram semelhantes, com exceção da área sob o pico referente ao PI em pH 4,0 que apresentou um valor cerca de 1,5 vezes maior que os sinais de PI nos demais valores de pH. Porém, no cromatograma obtido pela injeção de amostra de plasma branco após a análise de amostra de plasma fortificado em pH 4,0 é possível observar um efeito residual relacionado ao PI que não ocorre em pH 5,0 e 6,0 (**Figura 25**).

Dessa forma, optou-se por empregar uma fase móvel de exclusão composta por água ultrapura em pH entre 5,0 e 6,0 como condição, visto que, os cromatogramas obtidos foram satisfatórios em relação a todos as sulfonilureias analisado e ao PI, sem afetar a exclusão proteica pela coluna RAM-ADS.

Figura 24 – Áreas sob os picos de GB, GM, GZ e PI em função do pH da fase móvel de exclusão.

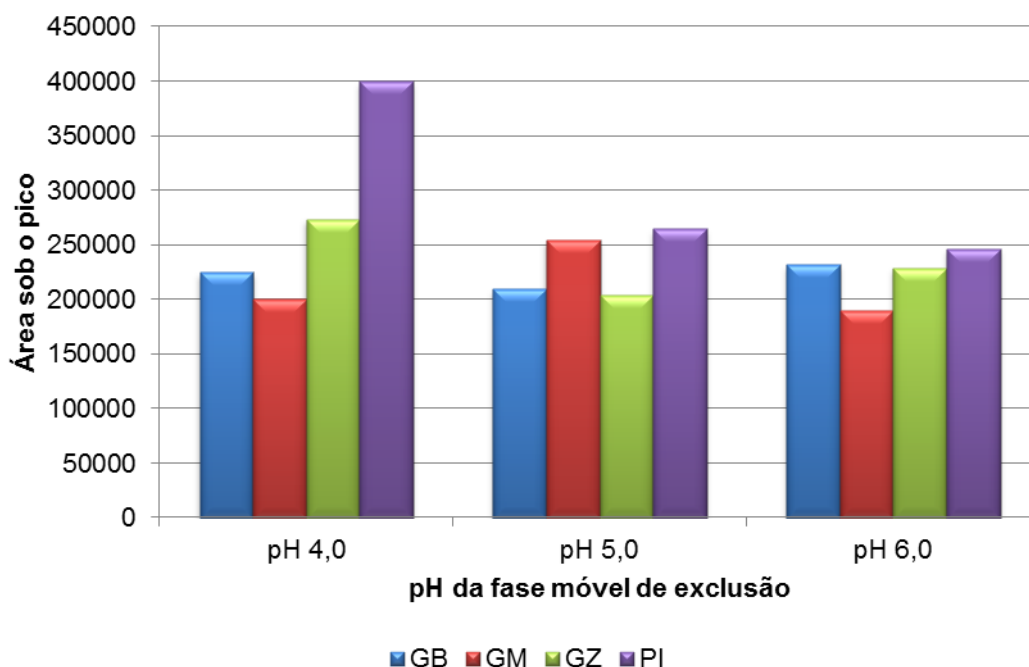
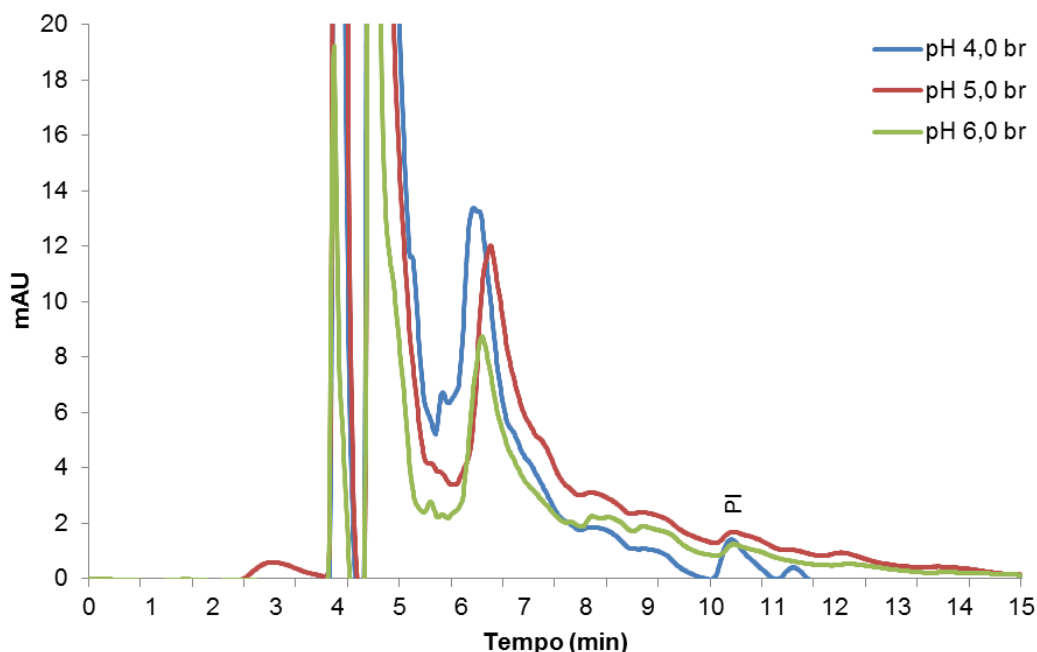


Figura 25 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma branco após análise de plasma fortificado, em diferentes valores de pH da fase móvel de exclusão, para análise de efeito residual. Volume de amostra injetado: 200 μL . Fase móvel de exclusão: água, pH: 4,0; 5,0; 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda de detecção: 230 nm.



5.2.6 Fase móvel analítica

O valor do pH da fase móvel influencia o grau de ionização e a polaridade dos analitos e, conseqüentemente, na retenção destes pela fase estacionária. No caso de compostos ácidos, o valor do pH da fase móvel deve estar 1,5 unidades abaixo do pK_a dos analitos, garantindo que eles estejam quase completamente na sua forma não-ionizada, diminuindo o grau de polaridade e aumentando sua retenção. As sulfonilureias avaliadas neste estudo possuem valores de pK_a semelhantes, com variação entre 4,3 e 6,0, desse modo, a fase móvel analítica utilizada deveria possuir um valor de pH próximo de 3,0, (TAYLOR, 2014).

Foram testadas diferentes condições de fase móvel para a segunda dimensão da análise, visando uma melhor separação e detecção dos analitos e do PI. Inicialmente realizou-se a injeção de 200 μL de plasma fortificado com GB, GM, GZ e PI, seguido da injeção do mesmo volume de plasma branco, utilizando como fase móvel analítica acetonitrila e ácido acético 1% (54:46 v/v) com vazão de 0,8 mL min^{-1} , obtendo uma fase móvel com pH próximo a 3,0. Como pode ser

observado na **Figura 26**, mesmo havendo boa separação e detecção tanto dos analitos quando do PI, há uma instabilidade da linha de base já durante o condicionamento da coluna analítica com sua fase móvel. Esta instabilidade aumentou durante a separação dos analitos pela coluna, afetando a determinação das sulfonilureias.

De maneira a manter uma fase móvel com valor de pH menor que o pKa dos fármacos e, ao mesmo tempo, evitar a instabilidade da linha de base, o ácido acético 1% foi substituído pelo tampão fosfato 10 mM em pH 3,0. O cromatograma obtido (**Figura 26**) apresentou uma linha de base estável, além de uma boa resolução entre os picos das sulfonilureias analisadas e do PI. Desse modo, definiu-se que a fase móvel analítica seria composta por acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0.

Em seguida, foram analisadas injeções de 200 μ L de plasma fortificado com as sulfonilureias em estudo, seguidas de injeções do mesmo volume de plasma branco, utilizando duas condições diferentes de fase móvel analítica com eluição em gradiente (**Tabelas 6 e 7**) e vazão de 0,8 mL min⁻¹.

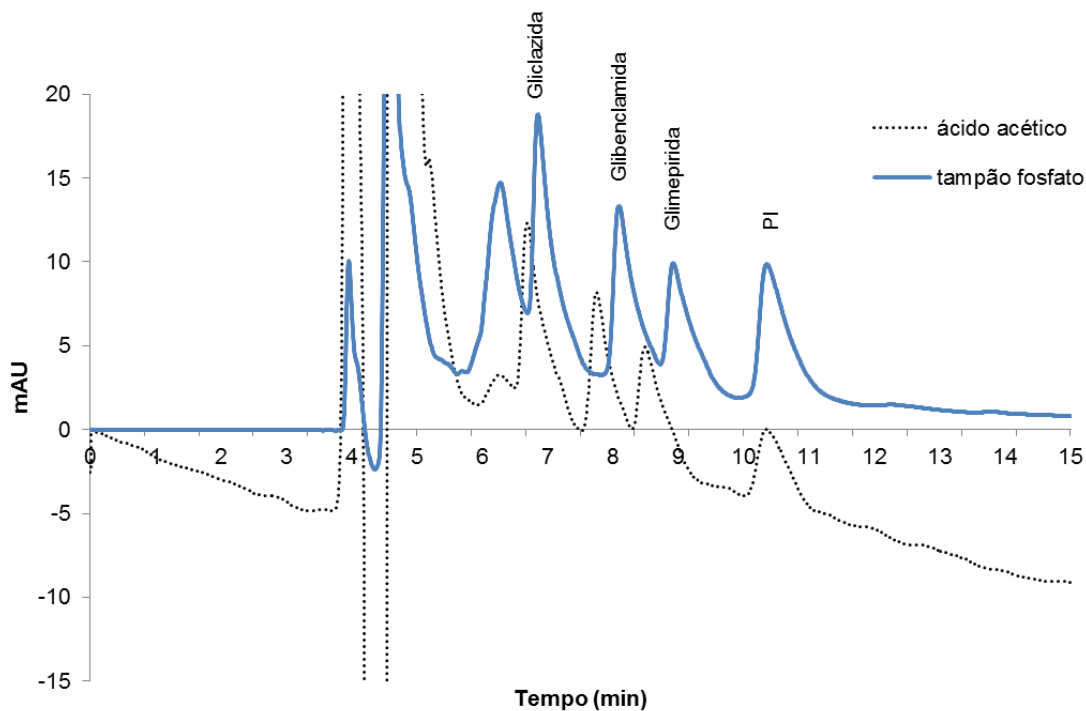
Tabela 6 – Condições do gradiente A para a fase móvel analítica.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Tampão* (%)	Eluição
0 - 3,0	50	50	Isocrática
3,0 - 15,0	50 → 53	50 → 47	Gradiente linear
15,0	53	47	Isocrática

Tabela 7 - Condições do gradiente B para a fase móvel analítica.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Tampão* (%)	Eluição
0 - 3,0	52	48	Isocrática
3,0 - 15,0	52 → 54	48 → 46	Gradiente linear
15,0	54	46	Isocrática

Figura 26 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica com vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.



Como podem ser observados nas **Figuras 27** e **28**, os cromatogramas obtidos pela análise do plasma fortificado, utilizando tanto o gradiente A quanto o gradiente B, apresentaram boa separação entre os picos dos analitos e do PI. Porém, em ambos os gradientes analisados, foi possível observar efeitos residuais nas leituras de plasma branco subsequentes, principalmente nos tempos de retenção referentes aos picos da GZ e do PI, que poderiam levar a interferências nas suas detecções e, conseqüentemente, nas quantificações. Esses efeitos residuais foram mais pronunciados no cromatograma referente ao gradiente A, o que pode ser explicado pela proporção inicial de solvente orgânico. É possível que a quantidade de acetonitrila não estivesse alta o suficiente durante o tempo de eluição dos analitos, fazendo com que eles permanecessem retidos na coluna RAM em certa quantidade, sendo eluídos somente na análise seguinte.

Figura 27 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 μ L. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: gradiente A, vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.

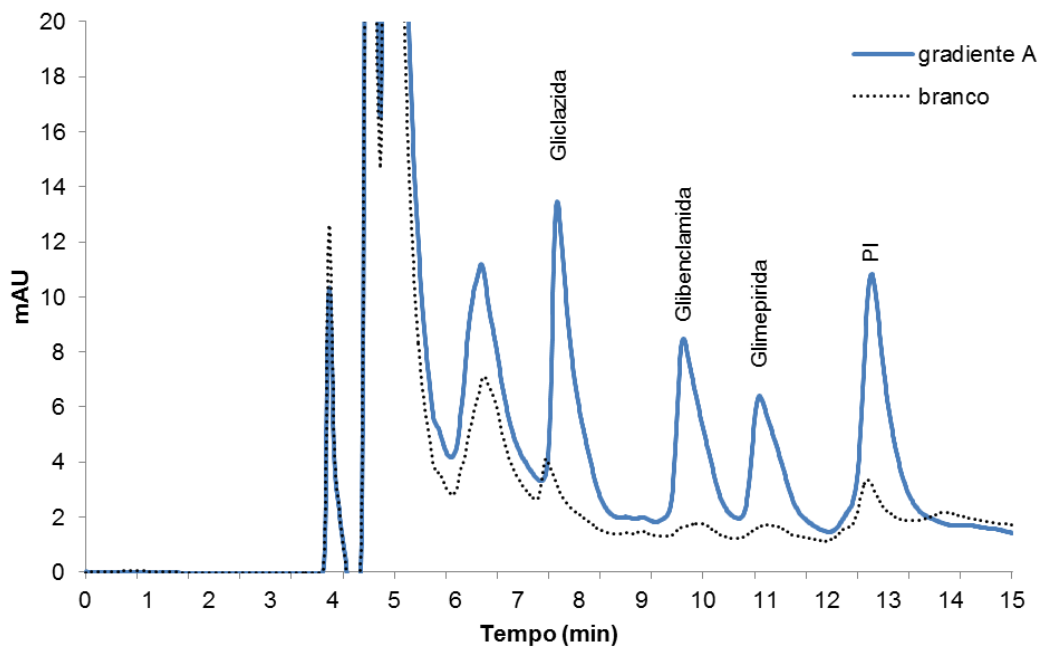
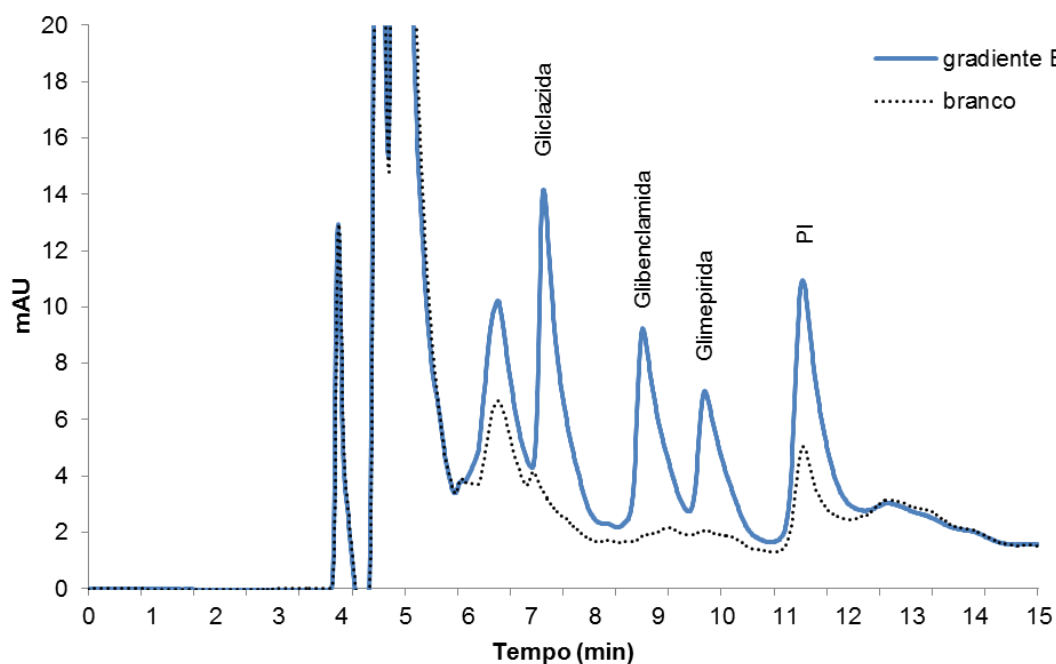


Figura 28 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de injeção de plasma branco. Volume de amostra injetado: 200 μ L. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: gradiente B, vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.



Em vista dos resultados obtidos, determinou-se que a fase móvel analítica seria composta por acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 com eluição no modo isocrático. Em seguida, foram testadas proporções de solvente orgânico, variando de 45 a 55%, de maneira a atingir uma condição que garantisse uma melhor resolução entre os picos, além de evitar sua sobreposição com algum pico interferente relacionado à matriz ou ao solvente. Ao final das análises, a condição que apresentou melhor resultado foi acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v), com vazão 0,8 mL min⁻¹.

5.2.7 Volume de injeção

A partir dos cromatogramas obtidos para cada volume de injeção analisado (20, 50, 100, 200, 500 µL), foram obtidas as áreas e alturas referentes aos picos de cada analito e ao PI. É possível observar que, para os volumes injetados de 20, 50 e 100 µL, houve um grande aumento de sinal para todos os picos em ordem crescente de volume de injeção. Ao se comparar os dados obtidos com os volumes de injeção de 20 e 50 µL, há uma média de aumento em torno de 130 e 150% nos valores de área e altura, respectivamente, de acordo com o aumento do volume de amostra injetado. Já os valores de área e altura, referentes aos picos dos cromatogramas obtidos pela injeção de 100 µL de plasma, tiveram um aumento de 200% em relação aos obtidos durante a análise de 50 µL de amostra (**Figura 29**).

A partir da observação desses dados era esperado que, conforme o volume de amostra injetado aumentasse, também iriam ocorrer aumentos nos valores de área e altura dos picos dos cromatogramas. Porém, ao se comparar os dados da injeção de 200 µL com os dados referentes à injeção de 100 µL, observou-se que não houve um aumento significativo dos sinais, sendo este de apenas 8 e 4% para os valores de área e altura, respectivamente. Já em relação aos dados obtidos pela injeção de 500 µL de amostra, ocorreu em média uma diminuição de 5%, tanto para os valores de área quanto de altura, quando estes eram comparados aos obtidos pela injeção de 200 µL de amostra (**Tabela 8**).

Figura 29 – Aumento das porcentagens de área e altura dos picos de GB, GM, GZ e PI em função do volume de plasma injetado.

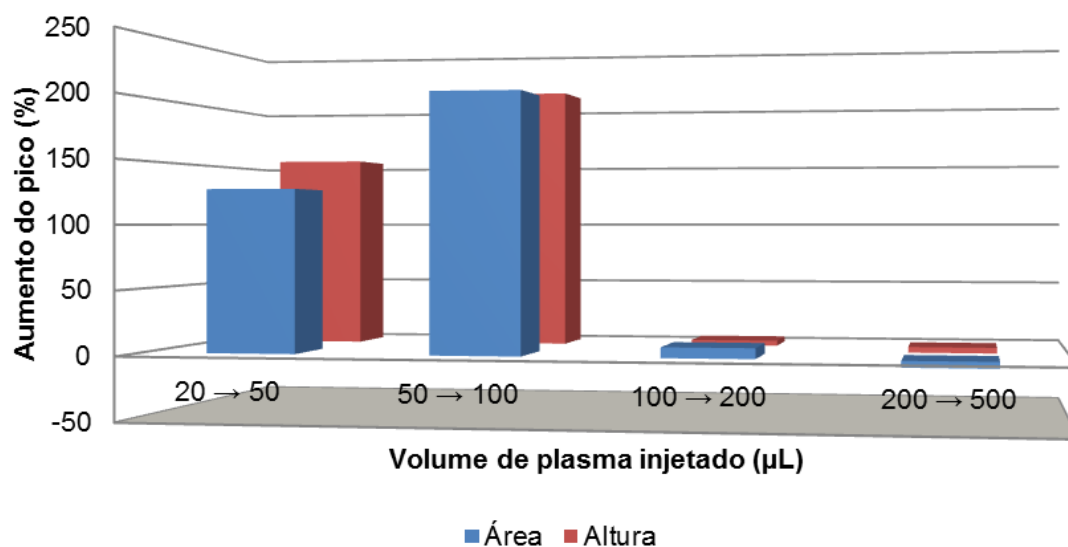
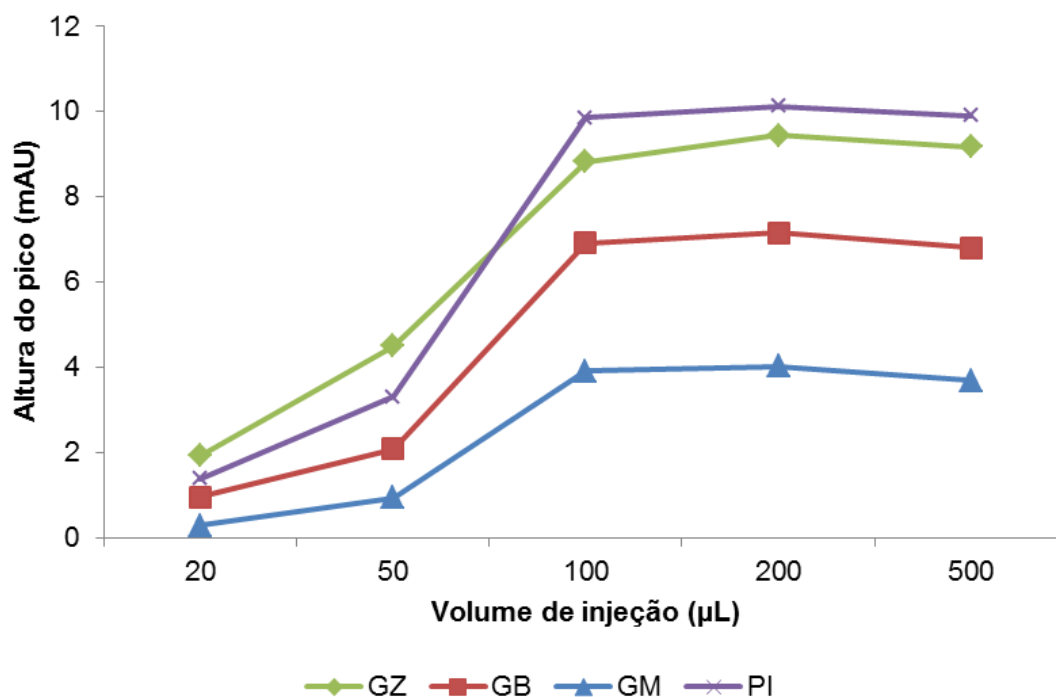


Tabela 8 – Variação das porcentagens de aumento das áreas e alturas dos picos em função do volume de plasma injetado (µL).

		20 → 50 (%)	50 → 100 (%)	100 → 200 (%)	200 → 500 (%)
Área	GZ	133,1	95,9	18,1	-3,8
	GB	89,4	226,0	7,3	-5,5
	GM	200,1	313,1	4,4	-8,4
	PI	88,0	173,3	2,8	-2,6
	média	127,6	202,1	8,2	-5,1
Altura	GZ	133,5	96,2	7,1	-2,9
	GB	116,6	232,2	3,6	-4,9
	GM	228,2	315,5	2,9	-8,3
	PI	137,6	197,3	2,8	-2,2
	média	154,0	210,3	4,1	-4,6

Supõe-se que essa estagnação dos valores esteja relacionada a uma possível saturação da coluna RAM e, conseqüentemente, da sua capacidade de adsorver os analitos. Com isso, os analitos em excesso estariam sendo excluídos juntamente com as proteínas plasmáticas, justificando o pequeno aumento nos sinais quando volumes maiores de amostra eram injetados. Em função da diminuição do sinal quando se injetou 500 µL de amostra, definiu-se que o volume de injeção da amostra no método seria de 200 µL, já que houve um pequeno aumento nos sinais em relação à injeção de 100 µL de plasma, como pode ser visto na **Figura 30**.

Figura 30 – Aumento da altura dos picos de GB, GM, GZ e PI em função do volume de plasma injetado (μL).



5.3 Precipitação proteica

De maneira a avaliar a influência do preparo da amostra na qualidade do sinal obtido no cromatograma, foram comparadas duas técnicas isoladas, PP e SPE com coluna RAM-ADS, além da combinação dessas duas técnicas (RAM+PP). No caso do método que empregou apenas PP, a análise da amostra de plasma foi realizada com o sistema cromatográfico em modo unidimensional, utilizando apenas a coluna analítica.

As respostas (área e altura dos picos) obtidas com as amostras, cuja exclusão de proteínas plasmáticas foi realizada com a coluna RAM-ADS, foram semelhantes às aquelas obtidas pelas amostras que foram submetidas à combinação das duas técnicas (**Figuras 31 e 32**). A adição de uma etapa extra ao preparo de amostra seria mais uma fonte de erro durante a manipulação da matriz biológica, além de levar a um aumento no tempo total de análise, principalmente pelo fato da PP se tratar de uma técnica convencional de preparo

de amostras. Desse modo, entendeu-se que não haveria necessidade de adicionar a técnica de PP antes da injeção da amostra no sistema bidimensional.

Figura 31 – Variação dos valores de área dos picos de GB, GM, GZ e PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado (μL).

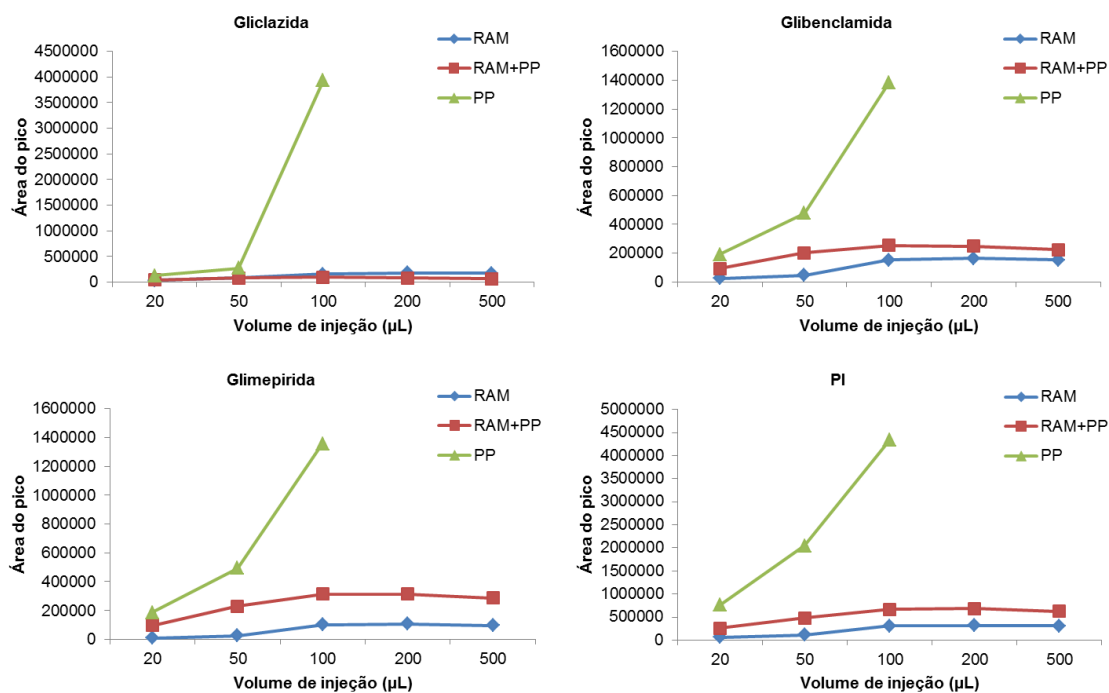
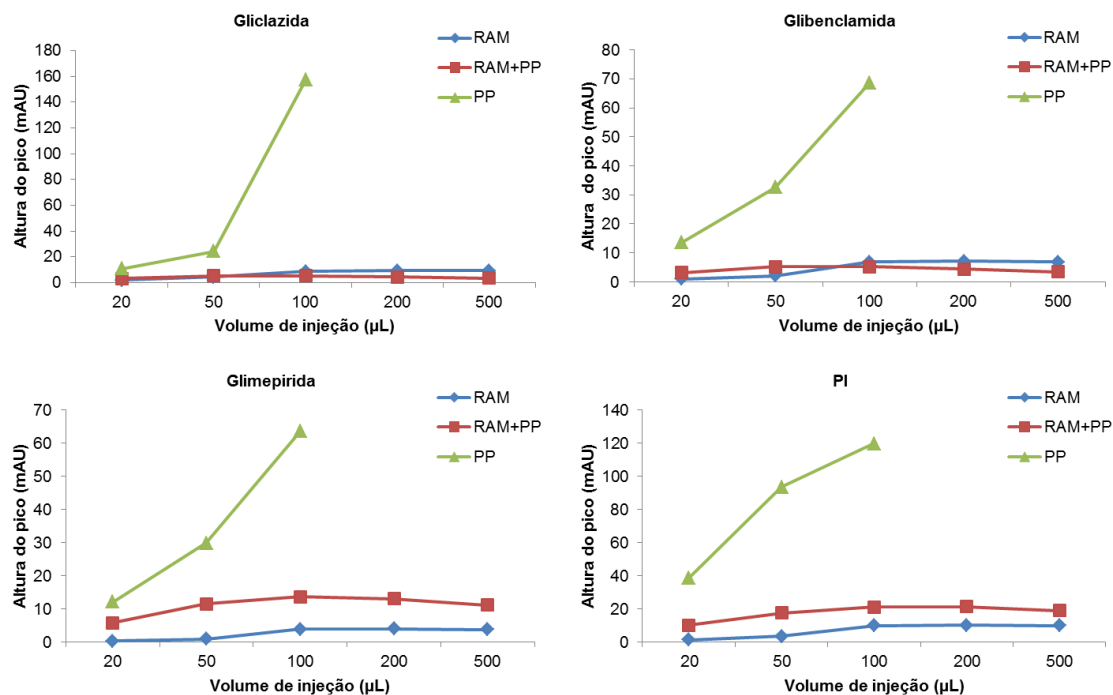


Figura 32 – Variação dos valores de alturas dos picos de GB, GM, GZ e PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado (μL).



Quando somente a técnica de PP foi utilizada para o preparo da amostra, observou-se um aumento dos valores de altura para todos os picos dos cromatogramas (**Figura 33**), conforme o volume de plasma injetado aumentava. Este aumento foi muito mais pronunciado quando o volume de 100 μL foi injetado, sendo, que os valores de altura dos picos das sulfonilureias e do PI foram em média 14 vezes maiores do que os obtidos quando somente a coluna RAM-ADS foi utilizada no preparo de amostra (**Tabela 9**).

Figura 33 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando PP como técnica de preparo de amostra. Volume de amostra injetado: 20, 50 e 100 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.

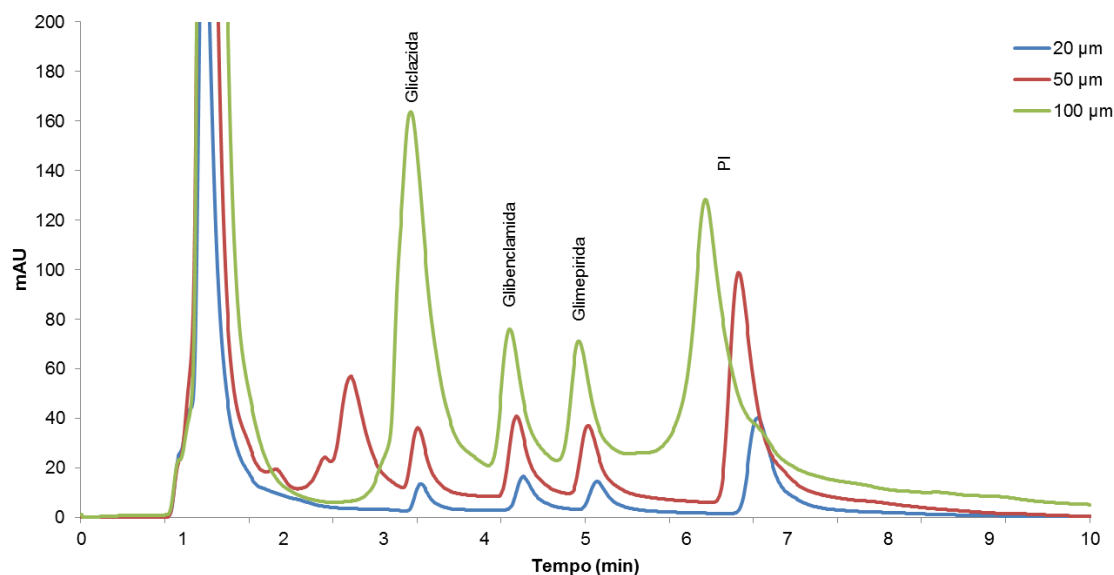
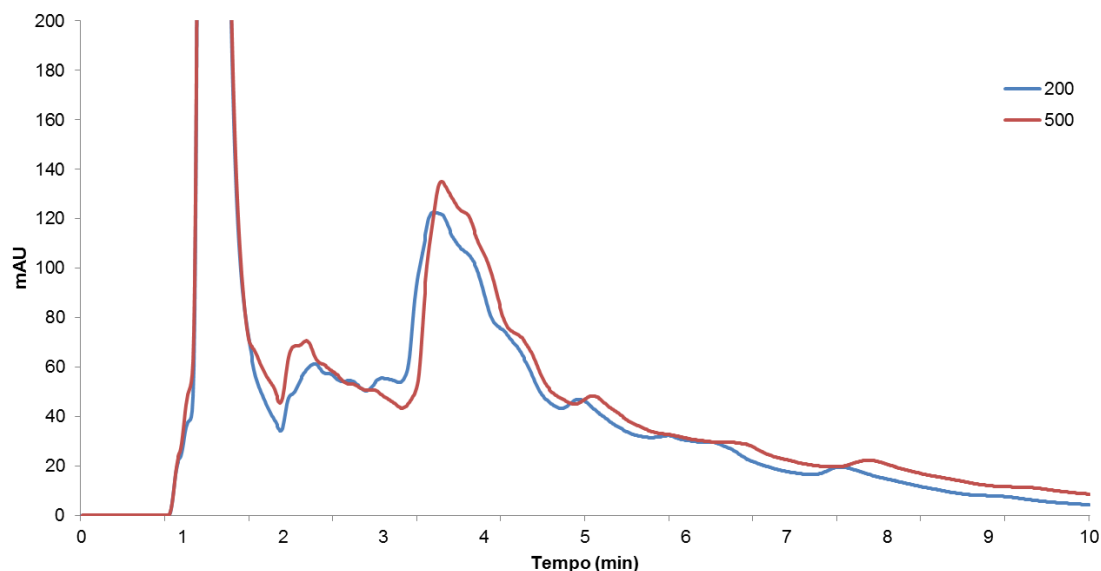


Tabela 9 – Altura dos picos das sulfonilureias e do PI em função da técnica de preparo de amostras utilizada e do volume de plasma injetado.

Analito	RAM			PP		
	20 μL	50 μL	100 μL	20 μL	50 μL	100 μL
GZ	1,926	4,497	8,822	10,951	24,283	157,141
GB	0,961	2,082	6,917	13,598	32,584	68,724
GM	0,287	0,942	3,914	12,083	29,77	63,488
PI	1,396	3,317	9,861	38,685	93,384	119,8

No entanto, para as análises que passaram unicamente pela PP como etapa de preparo de amostra, não foi possível realizar a identificação dos picos dos analitos quando eram injetados volumes maiores que 100 μL de plasma devido à falta de resolução entre eles e pela instabilidade da linha de base (**Figura 34**).

Figura 34 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando PP como técnica de preparo de amostra. Volume de amostra injetado: 200 e 500 μL . Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.



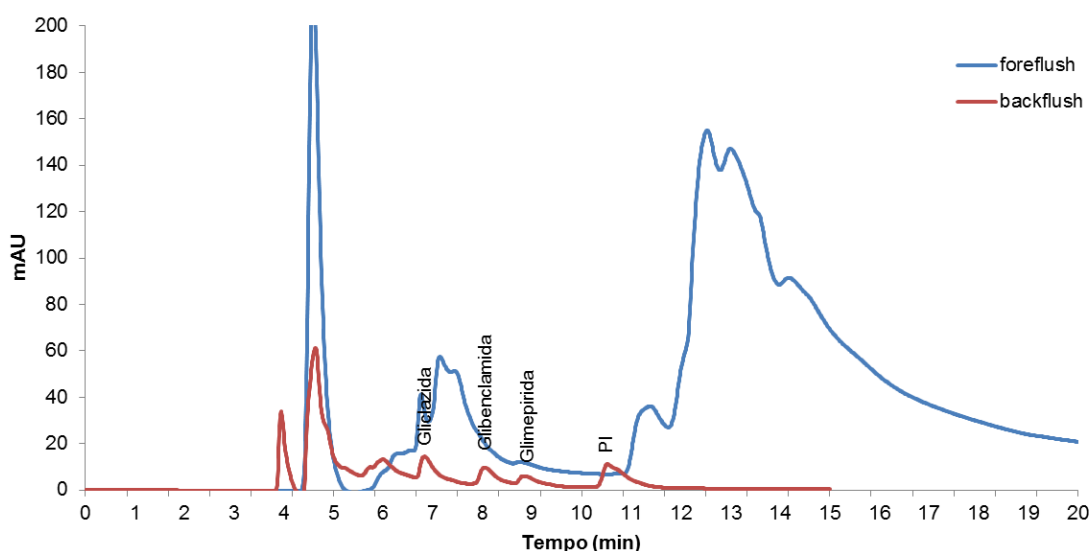
Em vista do aumento do tempo total de análise e das chances de erro gerados pela inclusão de uma etapa não automatizada no preparo de amostras, juntamente com o fato da limitação de volume de plasma a ser injetado, optou-se por não utilizar a PP como técnica para exclusão das proteínas plasmáticas. Desse modo, foi mantida a extração em fase sólida pela coluna RAM como técnica de preparo de amostras.

5.4 Backflush x foreflush

Após a otimização das condições cromatográficas a serem utilizadas, foi avaliado qual modo de configuração do sistema bidimensional, *backflush* ou *foreflush*, seria mais adequado para a determinação simultânea da GB, GM e GZ, a partir do método desenvolvido. Para isso, foram realizadas injeções de plasma humano fortificado com as três sulfonilureias no sistema cromatográfico com eluição no modo *backflush* e, em seguida, no modo *foreflush*, com as devidas alterações nas tubulações e posicionamento da válvula.

Na **Figura 35** está representada a sobreposição dos cromatogramas obtidos para cada um dos modos de eluição analisados. Observa-se que para o modo de eluição *foreflush* não há uma resolução efetiva entre os picos das sulfonilureias e do PI, não sendo possível identifica-los e nem quantifica-los. Esta sobreposição dos picos pode ser justificada pela direção do vazão da fase móvel analítica durante o processo de eluição dos analitos no modo *foreflush*.

Figura 35 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado utilizando dois modos de eluição do sistema bidimensional: *backflush* e *foreflush*. Volume de amostra injetado: 200 μ L. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: 1,0 mL min^{-1} . Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: 0,8 mL min^{-1} . Comprimento de onda: 230 nm.



Após a amostra biológica passar pela coluna de extração, os analitos ficarão retidos na cabeça da coluna RAM, devido à força reduzida da fase móvel (água). Com a viragem da válvula, a fase móvel analítica percorre o sistema de maneira a eluir os analitos da coluna RAM em direção à coluna analítica. No modo *foreflush*, a direção do fluxo da fase móvel analítica é a mesma da fase móvel extratora; com isso os analitos irão percorrer todo o comprimento da coluna RAM antes de passarem para a coluna analítica. Este caminho a ser percorrido pode levar a uma adsorção dos analitos ao longo da coluna RAM durante todo o tempo de passagem da fase móvel, o que pode causar um alargamento dos seus picos no cromatograma, além de eluir possíveis interferentes que poderiam estar

adsorvidos ao longo da coluna RAM. Devido à configuração do sistema, não é possível retornar a válvula para a posição inicial após o período de eluição dos analitos; com isso a fase móvel analítica irá percorrer todo o sistema durante a etapa de separação, causando um aumento no volume extra-coluna contribuindo para o alargamento dos picos e da sua sobreposição.

Já no modo *backflush*, a direção da fase móvel analítica é oposta àquela da fase móvel extratora. Desse modo, os analitos adsorvidos na cabeça da coluna RAM serão eluídos diretamente na coluna analítica, sem o risco de serem adsorvidos ao longo da coluna RAM, evitando o alargamento dos picos. O fluxo da fase móvel em direção oposta também irá garantir uma maior integridade da coluna analítica e menor influência de interferentes na análise já que, caso algum interferente esteja adsorvido na fase estacionária da coluna RAM, ele possuirá menor afinidade pela fase móvel analítica ficando retido no comprimento da coluna durante o período de eluição dos analitos (SADÍLEK *et al.*, 2007).

A configuração do sistema cromatográfico no modo *backflush* permite o retorno da válvula para sua posição inicial ao fim do período de eluição dos analitos, diminuindo o volume extra-coluna do sistema e aumentando a qualidade dos picos obtidos durante a análise. Em vista dos resultados obtidos e do menor tempo gasto para a análise das sulfonilureias em estudo (apenas 12 minutos), selecionou-se a configuração do sistema cromatográfico bidimensional em modo de eluição *backflush* para o método desenvolvido.

5.5 Condições cromatográficas desenvolvidas

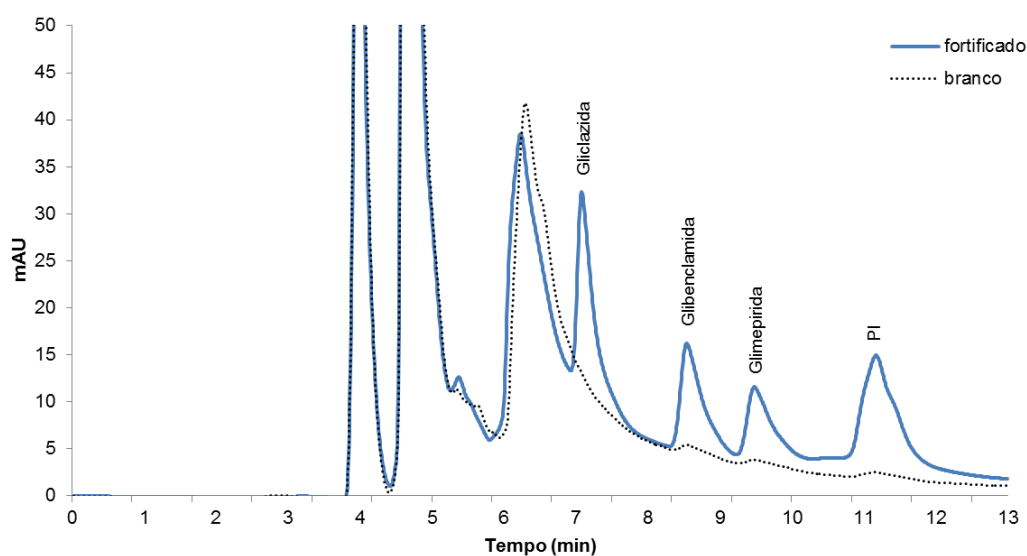
Ao final da otimização e dos testes realizados relacionados ao preparo da amostra e à configuração do modo de eluição do sistema cromatográfico bidimensional, foi desenvolvido um método para a determinação simultânea de três sulfonilureias (GB, GM e GZ) em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu 10A VP com detector DAD, com sistema bidimensional em modo de eluição *backflush*.

Na primeira dimensão (fase de exclusão) utilizou-se uma coluna RAM-ADS Lichrocart C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 µm), fase móvel composta por água

ultrapura pH 6,0, com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de viragem de válvula (para exclusão das proteínas plasmáticas) de 3 minutos. Na segunda dimensão (fase analítica) utilizou-se uma pré-coluna C18 (4,0 mm x 3,0 mm) acoplada a uma coluna analítica Poroshell 120 C18 (100 x 4,6 mm, $2,7 \mu\text{m}$) e fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v) com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

O tempo de eluição dos analitos da coluna RAM para a coluna analítica, passagem da primeira dimensão para a segunda, foi de 1 minuto. O PI utilizado foi o ácido flufenâmico, as colunas foram mantidas em temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, o volume de injeção foi de $200 \mu\text{L}$ e os fármacos mais o PI foram monitorados em 230 nm. O tempo total da análise, englobando o tempo referente à etapa cromatográfica (8 minutos) e o tempo para o preparo da amostra (3 minutos para exclusão proteica e 1 minuto para eluição dos analitos) foi de 12 minutos (**Figura 36**).

Figura 36 – Cromatogramas obtidos a partir da injeção de plasma fortificado seguido de plasma branco utilizando o método otimizado em modo *backflush*. Volume de amostra injetado: $200 \mu\text{L}$. Fase móvel de exclusão: água ultrapura, pH: 6,0; vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel analítica: acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46), vazão: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda: 230 nm.



Song e colaboradores desenvolveram em 2004 um método para determinação de GM em plasma humano utilizando um sistema CLAE multidimensional composto por uma coluna RAM com fase funcional mista, uma pré-coluna C18 e uma coluna analítica também C18, com partículas de 5 μm . O tempo total gasto para a análise da sulfonilureia foi de 40 minutos, sendo que a etapa de exclusão proteica foi de 7,1 minutos. Comparando o método apresentado neste trabalho com o método desenvolvido por Song, vemos que com menos da metade do tempo gasto naquele estudo foi possível determinar, simultaneamente, 3 sulfonilureias: GB, GM e GZ. Além disso, a etapa de exclusão proteica pela coluna RAM-ADS consumiu um tempo 2,3 vezes menor do que o consumido pela coluna RAM de fase funcional mista, empregada no estudo de Song e colaboradores.

6 CONCLUSÃO

O sistema *column-switching*, que empregou uma válvula de seis vias e duas posições, utilizado nesse estudo permitiu o uso de duas dimensões no sistema cromatográfico, sendo uma relacionada à etapa de preparo da amostra e outra relacionada à etapa analítica.

Com o sistema *column-switching* foi possível o uso de coluna RAM na etapa de preparo de amostras. Assim, foi possível a injeção direta de matrizes biológicas no sistema cromatográfico. Como vantagens desse sistema pode-se citar uma menor exposição do analista à matriz biológica e aos solventes utilizados, menor chance de erros devido ao manuseio das amostras e redução do tempo total gasto na análise.

A coluna RAM demonstrou ser eficiente para exclusão de proteínas plasmáticas, excluindo-as totalmente em um curto período de tempo, permitindo seu uso como técnica de preparo de amostras *online*.

O sistema bidimensional no modo de eluição *backflush* foi mais adequado que o modo *foreflush*, já que houve menor alargamento dos picos dos analitos e menor volume extra-coluna do sistema. Além disso, possibilitou uma maior rapidez da análise, aumentando a produtividade e reduzindo o gasto de solventes orgânicos.

O método desenvolvido demonstrou ser simples e rápido, além de possibilitar a determinação simultânea de três sulfonilureias, glibenclamida, glimepirida e gliclazida, em amostras de plasma humano.

7 PRÓXIMAS ETAPAS

Ao final do desenvolvimento do método para determinação simultânea das três sulfonilureias, GB, GM e GZ, foi dado início ao processo de validação, com subsequente aplicação do método validado em amostras reais de voluntários que fizeram uso desses medicamentos. Porém, devido a problemas relacionados ao funcionamento do cromatógrafo, não foi possível finalizar a validação a tempo da defesa da dissertação. Desse modo, a validação e aplicação do método terão continuidade após a manutenção do equipamento, seguindo o protocolo de validação abaixo.

7.1 Protocolo de validação do método bioanalítico

7.1.1 Amostras biológicas

As amostras de plasma humano serão obtidas pela coleta de sangue de voluntários sadios realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG mediante aprovação do Comitê de ética da UFMG, protocolo CAAE número 45493514.9.0000.5149.

As coletas para preparo das amostras de plasma normal e hemolisado serão realizadas no período da manhã, com voluntários em jejum ou com leve desjejum, caracterizado por alimentação pouco calórica e sem alimentos contendo café ou chocolate. Já as coletas para o preparo das amostras de plasma lipêmico serão realizadas em período pós-prandial.

Todas as coletas serão realizadas utilizando tubos contendo heparina. Em seguida, as amostras de sangue deverão ser centrifugadas a 480 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante obtido (plasma) será separado e armazenado a temperatura de -70°C até o seu uso. Para obtenção das amostras de plasma hemolisado, serão realizados ciclos de resfriamento e agitação em vórtex das amostras de plasma normal.

As coletas dos voluntários que fizerem uso dos medicamentos GB, GM e GZ serão realizadas de maneira semelhante às demais amostras, com exceção do

horário em que a coleta será realizada, sendo determinado em função do t_{\max} de cada fármaco após a administração oral da dose recomendada.

7.1.2 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas para a validação do método serão realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu 10A VP com detector DAD, sistema bidimensional em modo *backflush*. Na primeira dimensão será utilizada coluna RAM-ADS Lichrocart C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 μm) e fase móvel composta por água ultrapura pH 6,0, com vazão de 1,0 mL min^{-1} . O tempo gasto para a exclusão proteica será de 3 minutos e o tempo de eluição dos analitos para a segunda dimensão será de 1 minuto. Na segunda dimensão será utilizada pré-coluna C18 (4,0 mm x 3,0 mm) acoplada a coluna analítica Poroshell 120 C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 μm), fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (54:46 v/v) com vazão de 0,8 mL min^{-1} . A temperatura do forno deverá ser estabelecida em 35 °C, o volume de injeção será de 200 μL e o comprimento de onda de detecção de 230 nm.

7.1.3 Parâmetros de validação do método bioanalítico

Para a validação do método bioanalítico desenvolvido serão avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, estudo de estabilidade dos analitos em matriz biológica e dos analitos e PI em solução de acordo com a RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA e de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da EMA, 2011. Além disso, será realizado o ensaio de recuperação de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA, publicado em 2001 (BRASIL, 2012; FDA, 2001, EMA, 2011).

7.1.3.1 Seletividade

O ensaio de seletividade será realizado a partir da comparação das áreas dos picos interferentes no tempo de retenção de cada analito e próximos ao tempo

de retenção do PI, com aqueles obtidos nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ). Desse modo, será avaliada a capacidade do método de diferenciar e quantificar tanto os analitos quanto o PI na presença dos demais componentes da amostra.

Para avaliação da seletividade, serão utilizadas seis amostras de plasma branco de fontes distintas, sendo quatro amostras de plasma normal, uma de plasma lipêmico e uma amostra preparada com plasma hemolisado. Também serão avaliadas duas injeções de uma amostra LIQ. A partir das condições cromatográficas do método desenvolvido, a seletividade será avaliada por meio da seguinte sequência analítica:

1. 4 amostras de plasma branco normal;
2. 1 amostra de plasma branco lipêmico;
3. 1 amostra de plasma branco hemolisado;
4. 2 injeções de amostra LIQ.

Após a conclusão da análise, as porcentagens dos picos interferentes serão determinadas em relação às áreas apresentadas na amostra LIQ. As respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e os próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI. Caso uma ou mais amostras apresentem interferentes acima dos limites estabelecidos, novas amostras de outras seis fontes distintas devem ser analisadas. Permanecendo valores acima do limite no segundo grupo de análise, o método deverá ser alterado.

7.1.3.2 Efeito residual

O efeito residual, também chamado de *carryover* é caracterizado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito e/ou do PI devido à contaminação da análise proveniente de um processamento anterior. Caso este seja inevitável durante a análise, alguns procedimentos devem ser adotados na execução do método de maneira a controlá-lo, evitando alterações na sua precisão e exatidão.

Para este ensaio, serão realizadas três injeções da mesma amostra de plasma branco, sendo uma antes do processamento de uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ) e duas logo em seguida. Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, o efeito residual será avaliado empregando a seguinte sequência analítica:

1. 1 injeção de amostra branco;
2. 1 injeção de amostra LSQ;
3. 2 injeções de amostra branco;

A partir da comparação das áreas sob os picos dos cromatogramas das amostras de plasma branco, injetadas após a amostra LSQ, com aquelas obtidas no cromatogramas da amostra LIQ será possível observar a ocorrência ou não de *carryover*.

No caso de presença de picos interferentes, suas porcentagens deverão ser calculadas em relação às áreas dos respectivos analitos e PI na concentração do LIQ. As respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do analito deverão ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e as respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do PI deverão ser inferiores a 5% da resposta do PI.

7.1.3.3 Recuperação

A avaliação da recuperação será realizada de acordo com o preconizado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA, a partir da comparação da resposta obtida pelas análises dos analitos e do PI na matriz biológica em relação às respostas obtidas pelos padrões em solução de acetonitrila e água (1:1 v/v), nas mesmas concentrações. O teste será realizado em três níveis de concentração: CQB, CQA e controle de qualidade médio (CQM). Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, a recuperação será avaliada empregando a seguinte sequência analítica:

1. 5 injeções de amostra CQB em solução;
2. 5 injeções de amostra CQM em solução;

3. 5 injeções de amostra CQA em solução;
4. 5 injeções de amostra CQB em matriz biológica;
5. 5 injeções de amostra CQM em matriz biológica;
6. 5 injeções de amostra CQA em matriz biológica.

O cálculo da recuperação será realizado utilizando a equação:

$$Rec = \frac{\text{Área do pico do analito em matriz biológica}}{\text{Área do pico do padrão em solução}}$$

A recuperação obtida não precisa ser necessariamente 100%, mas os valores de recuperação dos analitos em plasma devem ser consistentes com os valores obtidos dos padrões em solução.

7.1.3.4 Curva de calibração

De maneira a definir a relação entre a concentração conhecida do analito e a resposta do instrumento, deverão ser construídas e avaliadas três curvas de calibração constituídas por amostras de plasma branco e zero (amostra de plasma branco adicionada de PI), além das amostras de seis níveis de concentração dos analitos adicionadas de PI. Esses níveis serão determinados em função dos valores de $C_{\text{máx}}$ para GB, GM e GZ, obtidos na literatura.

Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, a curva de calibração será desenvolvida seguindo a seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções de amostra zero;
3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva.

Os pontos que apresentarem desvio maior que 20% em relação a concentração nominal para os padrões do LIQ e 15% para os demais níveis de calibração, serão excluídos, não sendo utilizados para o cálculo da equação da reta. Nenhum ponto aprovado será excluído do cálculo da equação da reta.

A equação da curva obtida pela relação entre as respostas do detector e as concentrações conhecidas dos analitos serão plotadas a partir de um modelo

matemático linear, desconsiderando as repostas das amostras branco e zero. Será utilizado o fator de ponderação de menor valor para o cálculo da soma dos erros relativos das concentrações nominais dos padrões de calibração, em relação aos valores obtidos na equação. A curva de calibração será considerada aprovada quando obtiver 75% dos pontos com desvios inferiores aos descritos, além de 6 níveis de concentração aprovados juntamente com LIQ e LSQ.

Caso seja proposto um modelo não linear, será demonstrado matematicamente o porquê do modelo linear não ter sido utilizado. Além disso, para a construção da curva de calibração, serão inclusas, no mínimo, oito amostras de diferentes concentrações.

7.1.3.5 Precisão e exatidão

Simultaneamente às curvas de calibração, serão realizados os testes de precisão e exatidão de maneira a verificar a proximidade dos resultados obtidos por repetidas análises de uma única fonte e a determinar a concordância entre o resultado de uma análise e seu valor de referência, respectivamente.

Ambos os ensaios serão realizados em uma mesma corrida analítica (intracorrída) e em, no mínimo, três corridas realizadas em dias diferentes (intercorrída), a partir de seis injeções das amostras LIQ, CQB, CQA, CQM e controle de qualidade de diluição (CQD). A amostra CQD será preparada pela adição dos analitos em concentração superior ao LSQ, especificamente a partir do dobro da concentração do CQA, diluída em plasma branco na proporção de 1:1 (v/v).

Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, os ensaios de precisão e exatidão serão desenvolvidos por meio da seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções de amostra zero;
3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva;
4. 6 injeções de amostra LIQ;
5. 6 injeções de amostra CQB;

6. 6 injeções de amostra CQM;
7. 6 injeções de amostra CQA;
8. 6 injeções de amostra QLD.

Para o ensaio de precisão, serão calculados os valores de desvio padrão relativo (DPR) a partir da fórmula abaixo, não sendo admitidos valores de DPR maiores que 15% e 20% para os controles de qualidade e para o LIQ, respectivamente.

$$DPR = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

Já para o ensaio de exatidão, serão calculados os valores do erro padrão relativo (EPR) a partir da fórmula abaixo, não sendo admitidos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ em que podem ser admitidos valores até a faixa de $\pm 20\%$.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

7.1.3.6 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

O estudo de estabilidade visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro dos limites estabelecidos, em uma matriz e condições específicas. Portanto, para este parâmetro serão realizados os seguintes estudos de estabilidade: ciclos de congelamento e descongelamento (ECC), curta duração (ECD) e longa duração (ELD). Em todos os ensaios de estabilidade, simultaneamente à curva de calibração, serão analisadas amostras de CQB e CQA em quadruplicata, reproduzindo as condições de armazenamento (congelamento a -70°C), preparo e análise das amostras do estudo. A estabilidade será demonstrada quando não houver desvio superior a 15% da média de todas as concentrações obtidas, em relação ao valor nominal.

Cada período dos ensaios de estabilidade foi determinado em função da estimativa do tempo em que as amostras dos voluntários poderiam ficar expostas a diferentes condições de temperatura durante todo o tempo de análise, além da

logística do laboratório em relação ao seu período de funcionamento e manutenção dos equipamentos.

Inicialmente, um conjunto de amostras CQB e CQA recém-preparadas será analisado de maneira a verificar a eficiência do procedimento de adição de padrão ao plasma branco, visto que erros nessa etapa poderiam levar a concentrações inferiores ou superiores ao valor nominal. Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, as análises das amostras recém-preparadas serão desenvolvidas empregando a seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções amostra zero;
3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva;
4. 4 injeções de amostra CQB;
5. 4 injeções de amostra CQA.

As amostras fracionadas e congeladas para os demais estudos de estabilidade serão utilizadas somente no caso da aprovação dos resultados das análises recém-preparadas, ou seja, desvios de concentração dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal. Do contrário, o procedimento de adição padrão às amostras recém-preparadas deverá ser realizado novamente.

7.3.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Para este ensaio, inicialmente as amostras serão congeladas à -70°C durante doze horas. Após o descongelamento completo das amostras à temperatura de trabalho de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$., estas deverão ser congeladas novamente nas mesmas condições. O número de ciclos de congelamento e descongelamento é definido como um número a mais ao que são submetidas às amostras em estudo

As amostras serão analisadas ao final do último ciclo, utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, empregando a seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções amostra zero;

3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva;
4. 4 injeções de amostra CQB da ECC;
5. 4 injeções de amostra CQA da ECC.

7.3.6.2 Estabilidade de curta duração

Neste caso, as amostras serão fortificadas e analisadas após permanecerem à temperatura de trabalho de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por tempo superior ao que as amostras em estudo são submetidas. A duração foi definida sobre a previsão de tempo que as amostras de voluntários descongeladas poderiam permanecer em espera antes do início da análise. Após o tempo determinado, as amostras serão analisadas seguindo a seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções amostra zero;
3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva;
4. 4 injeções de amostra CQB da ECD;
5. 4 injeções de amostra CQA da ECD.

7.3.6.3 Estabilidade de longa duração

Para esse ensaio, serão fortificadas e analisadas amostras congeladas à temperatura de -70°C , por um período maior que o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última. Após o tempo determinado, as amostras serão descongeladas completamente e analisadas conforme a seguinte sequência analítica:

1. 2 injeções de amostra branco;
2. 2 injeções amostra zero;
3. 2 injeções de cada um dos 7 níveis de concentração da curva;
4. 4 injeções de amostra CQB da ELL;
5. 4 injeções de amostra CQA da ELL.

7.1.3.7 Estabilidade do analito e PI em solução

A estabilidade dos analitos e do PI em solução (ESS), a partir das soluções utilizadas durante a validação, serão avaliadas nas temperaturas de trabalho ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e de armazenamento ($5 \pm 3^\circ\text{C}$), por tempo superior ao período de uso ou armazenamento a que serão expostas a essas condições.

Para isso, soluções de trabalho em duas concentrações (LIQ e LSQ), serão preparadas a partir da diluição de soluções primárias recém-preparadas, sendo que as soluções do PI utilizadas deverão ser diluídas, de maneira a corresponder à concentração do PI em plasma. Todas as soluções serão preparadas em mistura de acetonitrila e água (1:1 v/v).

Inicialmente cada solução será fracionada em dois *vials* (A e B) devidamente lacrados para impedir a evaporação do solvente. Em seguida, o *vial* A de cada solução será imediatamente analisado sob as condições do método desenvolvido e os demais mantidos a temperatura de trabalho durante todo o período do ensaio. Ao término das análises iniciais, o *vial* B de cada solução será analisado para avaliação da ESS à temperatura de trabalho e os *vials* A recém-analisados deverão ser transferidos para um refrigerador a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Ao final dos ensaios dos *vials* B, os *vials* A serão analisados novamente.

A média das respostas instrumentais das soluções em estudo será comparada com a média daquelas obtidas utilizando-se soluções recém-preparadas dos analitos e do PI, de acordo com a equação abaixo. As soluções serão consideradas estáveis quando não forem observadas variações superiores a 10%.

$$\text{Variação\%} = \frac{(\text{Área média}_{\text{experimental}} - \text{Área média}_{\text{referência}}) \times 100}{\text{Área média}_{\text{referência}}}$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 317-321, 2004.

ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2569-2580, 2010.

ABRAHIM, A.; AL-SAYAH, M.; SKRDLA, P.; BEREZNITSKI, Y.; CHEN, Y.; WU, N. Practical comparison of 2.7 μ m fused-core silica particles and porous sub-2 μ m particles for fast separations in pharmaceutical process development. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 131–137, 2010.

ABURUZ, S.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J. 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**, v. 817, p. 277–286, 2005.

AGRAWAL, Y.K.; GOGOI, P.;J.; MANNA, K.; BHATT, H.G.; JAIN, V.K. A supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of metformin and gliclazide in human plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 72, n. 1, p. 50-57, 2010.

ALBU, F.; GEORGIT, C.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Determination of glibenclamide in human plasma by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization/MS-MS detection. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 222–229, 2007.

ALI, I.; GAITONDE, V.D.; GRAHN, A. Halo columns: new generation technology for high speed liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p. 386-394, 2010.

American Diabetes Association. Disponível em: < <http://www.diabetes.org/>> Acesso em: 17 jun, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Position Statement. Diagnosis and classification of diabetes mellitus**, *Diabetes Care*, v. 36, suplemento 1, 2013, 8 p.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, 62, p. 2145-2148, 1990.

BAKHTIAR, R.; MAJUMDAR, T.K. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 55, p. 227-243, 2007.

BOOS, K.S.; GRIMM, C.H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 3, 1999.

BOOS, K.S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted access media in HPLC. Part I. Classification and review. **LC-GC**, v. 15, p.602-611, 1997.

BOOS, K.S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D.; EISENBEI, F. Alky-diol silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 684-690, 1995.

BRASIL, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014/2015**, São Paulo, 2015, 390 p.

BRASIL, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Posicionamento Oficial SBD nº01/2014. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2: Algoritmo SBD 2014**, 2014, 27 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº27 de maio de 2012**. Brasília, 2012. ISSN 1677-7042.

CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1462-1469, 2006.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J.C.; CASS, Q. B. New trends in sample preparation in Brazil: an overview of bioanalytical applications by liquid chromatography. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 9-19, 2014.

CAVAZZINI, A.; GRITTI, F.; KACZMARSKI, K.; MARCHETTI, N.; GUIOCHON, G. Mass-Transfer Kinetics in a Shell Packing Material for Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 15, 2007.

CHAKRADHAR, L.; KALLEM, R.; KARTHIK, A.; SUNDARI, B.T.; RAMESH, S.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N.R. A rapid and highly sensitive method for the determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 22, p. 58-63, 2008.

CHANG, M.S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Historical review of sample preparation for chromatography bioanalysis: pros and cons. *Drug Development Research*, v. 68, p. 107-133, 2007.

CHAVES, A.R.; LEANDRO, F.Z.; CARRIS, J.A.; QUEIROZ, M.E.C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 2123-2129, 2010.

CHEN, B.; LIANG, Y.; GUO, F.; HUANG, L.; DENG, F.; CHEN, X.; WANG, Y. Rapid, simple, specific liquid chromatographic-electrospray mass spectrometry method for the determination of glibenclamide in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 185–191, 2004.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 191-219, 2008.

CHIAP, P.; RBEIDA, O.; CHRISTIAENS, B.; HUBERT, P.; LUBDA, D.; BOOS, K.S.; CROMMEN, J. Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 975, p. 145-155, 2002.

CUNLIFFE, J.M.; MALONEY, T.D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2 μ m particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3104 – 3109, 2007.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 544, p. 25-39, 1991.

DESTEFANO, J.J.; LANGLOIS, T.J.; KIRKLAND, J.J. Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: some performance comparisons with sub-2- μ m particles. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, 2007.

DOTSIKAS, Y.; KOUSOULOS, C.; TSATSOU, G.; LOUKAS, Y.L. Development of a rapid method for the determination of glimepiride in human plasma using liquid-liquid extraction based on 96-well format micro-tubes and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2055-2061, 2005.

DRUG BANK. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 14 jun, 2015.

EL-ENANY, N.M.; ABDELAL, A.A.; BELAL, F.F.; ITOH, Y.I.; NAKAMURA, M.N. Development and validation of a reversed phase- HPLC method for simultaneous determination of rosiglitazone and glimepiride in combined dosage forms and human plasma. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n.9, p.1-10, 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on Bioanalytical Method Validation**, 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/Document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf> Acesso em: 15 jan. 2014.

Food and Drug Administration (FDA). **Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation**, 2001, 25 p.

FOROUTAN, S.M.; ZARGHI, A.; SHAFATI, A.; KHODDAMC, A. Application of monolithic column in quantification of gliclazide in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 513–516, 2006.

GEDEON, C.; KAPUR, B.; ALEKSA, K.; KOREN, G. A simple and rapid HPLC method for the detection of glyburide in plasma original research communication (analytical). **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 167-173, 2008.

GEORGITA, C.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A.; Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. **Journal of Chromatography B**, v. 854, p. 211-218, 2007.

GHAI, D.; GANESH, G.L. HPLC method for determination of gliclazide in human serum. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 4258-4264, 2009.

GISH, D.J.; HUNTER, B.T.; FEIBUSH, B. Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 433, p. 254-268, 1988.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. 2080 p.

GUIOCHON, G.; GRITTI, F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1915-1938, 2011.

HAGESTAM, I.H.; PINKERTON, T.C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1757-1763, 1985.

HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers as affinity-bases separation media for sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1548-1565, 2009.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H. Synthesis of mixed-functional-phase silica supports for liquid chromatography and their applications to assays of drugs in serum. **Journal of Chromatography**, v. 535, p. 163-172, 1990.

HE, C.; LONG, Y.; PAN, J.; LI, K.; LIU, F. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 133-150, 2007.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.

HERMANSSON, J.; GRAHN, A. Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase. **Journal of Chromatography A**, v. 660, p. 119-129, 1994.

HORVATH, C.G.; PREISS, B.B.; LIPSKY, S.R. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967.

HUBER, J.F.K.; VAN DER LINDEN, R.; ECKER, E.; OREANS, M. Column switching in high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.83, p.267-277, 1973.

KANDA, T.; KUTSUNA, H.; OHTSU, Y.; YAMAGUCHI, M. Synthesis of polymer-coated mixed-functional packing materials for direct analysis of drug-containing serum and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.672, p. 51-57, 1994.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

KHATRI, J.; QASSIM, S.; ABED, O.; ABRAHAM, B.; AL-LAMI, A.; MASOOD, S. A novel extractionless HPLC fluorescence method for the determination of glyburide in the human plasma: application to a bioequivalence study. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 201-206, 2001.

KIM, H.; CHANG, K.Y.; LEE, H.J.; HAN, S.B. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 109-114, 2004.

KIM, H.; CHANG, K.Y.; PARK, C.H.; JANG, M.S.; LEE, J.; LEE, H.J.; LEE, K.R. Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS and comparison of sample preparation methods for glimepiride. **Chromatographia**, v. 60, p. 93-98, 2004.

KIM, H.; YUN, M.; KWON, K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of gliclazide in healthy volunteers. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 7, p. 564-568, 2003.

KIRKLAND, J.J. Controlled surface porosity supports for high speed gas and liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 218-220, 1969.

KIRKLAND, J.J. Superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1239-1245, 1992.

KIRKLAND, J.J.; LANGLOIS, T.J.; DESTEFANO, J.J. Fused Core Particles for HPLC Columns. **American Laboratory**, p. 18-21, 2007.

KIRKLAND, J.J.; TRUSZKOWSKI, F.A.; DILKS, C.H.; ENGEL, G.S. Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. **Journal of Chromatography A**, v. 890, p. 3-13, 2000.

KOBAYASHI, K.; KIMURA, M.; SAKOGUCHI, T.; KITANI, Y.; HATA, M.; MATSUOKA, A. Influence of blood proteins on biomedical analysis. III. Pharmacokinetics and protein binding of gliclazide. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 4, p. 436-442, 1981.

KOLE, P.X.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 199-217, 2010.

KRISHNAM, T.R.; IBRAHAM, I. Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 287-294, 1994.

KUO, C.; WUA, S. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for analysis of gliclazide in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, p. 131–135, 2005.

LAKSHMI, K.S.; RAJESH, T. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of glipizide, rosiglitazone, pioglitazone, glibenclamide and glimepiride in pharmaceutical dosage forms and human plasma. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 8, n. 1, p. 31-37, 2011.

LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S.J.F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean up in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 221-237, 1997.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, p. 16-20, 1991.

MAJORS, R.E. Advanced topics in solid-phase extraction: chemistries. **LC-GC North America**, v. 25, n. 1, p.1-14, 2007.

MALERCZYK, V.; BADIAN, M.; KORN, A.; LEHR, K.H.; WALDHAUSL, W. Dose linearity assessment of glimepiride (amaryl®) tablets in healthy volunteers. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 11, n. 4, p. 341-357, 1994.

MAURER, H.H.; KRATZSCH, C.; KRAEMER, T.; PETERS, F.T.; WEBER, A.A. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 63-73, 2002.

MISTRI, H.N.; JANGID, A.; SHRIVASTAV, P.S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 97-106, 2007.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 564 p.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MULLET, W.M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 263–273, 2007.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A.C. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 653–657, 2002.

NOBLE, J.E.; BAILEY, M.J.A. Quantitation of protein. In:_____. BURGESS, R.R.; DEUTSCHER, M.P. **Methods in Enzymology**. Guide to protein purification. Academic Press, 2009. cap. 8, p. 73-95.

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

O'NEIL, M.J. et al. **The Merck Index**. NJ, USA: Merck Research Laboratories, 2006.

PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J.; RATEIKE, J.D. An improved internal surface reversed phase. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n. 18, p. 3343-3352, 1992.

PISTOS, C.; KOUTSOPOULOU, M.; PANDERI, I. Improved liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination and pharmacokinetic study of glimepiride in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 394-401, 2005.

POLAGANI, S.R.; PILLI, N.R.; GAJULA, R.; GANDU, V. 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**, v. 3, n. 1 p. 9-19, 2013.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263-275, 2003.

Portal da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>> Acesso em: 17 jun, 2015.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAMALHO, A.C.R.; LIMA, M.L. Insulina e Antidiabéticos Orais. In: _____. SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 81, p. 805-823.

RANETTI, M.C.; IONESCU, M.; HINESCU, L.; IONICA, E.; ANUTA, V.; RANETTI, A.E.; STECOZA, C.E.; MIRCIOIU, C. Validation of a HPLC method for the simultaneous analysis of metformin and gliclazide in human plasma. **Farmacia**, v. 57, n. 6, p. 728-735, 2009.

SADÍLEK, P.; SATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007.

SALEM, I.I.; IDREES, J.; TAMIMI, J.I. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 103–109, 2004.

SELLERGREN, B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1578-1582, 1994.

SIDDIQUI, F.A.; SHER, N.; ZUBAIR, A.; SHAMSHAD, H.; SHAFI, N.; MIRZA, A.Z. Analysis of metformin, glimepiride and pioglitazone in human serum and its application to pharmacokinetics. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5096-5104, 2013.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>> Acesso em: 17 jun, 2015.

SOMAINI, L.; SARACINO, M.A.; MARCHESELLI, C.; ZANCHINI, S.; GERRA, G.; RAGGI, M.A. Combined liquid chromatography–coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. **Analytical Chimica Acta**, v. 702, p. 280-287, 2011.

SONG, Y.; MAENG, J.; HWANG, H.; PARK, J.; KIM, B.; KIM, J.; KIM, C. Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore high performance liquid chromatography with column-switching. **Journal of Chromatography B**, v. 810, p. 143–149, 2004.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 141-156, 2004.

SOUZA, K.C.; ANDRADE, G.F.; VASCONCELOS, I.; VIANA, I.M.O.; FERNANDES, C.; SOUZA, E.M.B. Magnetic solid-phase extraction based on mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles for analysis of oral antidiabetic drugs in human plasma. **Materials Science and Engineering C**, v. 40, p. 275-280, 2014.

SULTANA, N.; ARAYNE, M.S.; ALI, S.N.; ZUBERI, M.H. Simultaneous determination of glipizide and glimepiride by RP-HPLC in dosage formulations and in human serum. **Medicinal Chemical Research**, v. 21, p. 2443-2448, 2012.

SULTANA, N.; ARAYNE, M.S.; IFTIKHAR, B. Simultaneous Determination of Atenolol, Rosuvastatin, Spironolactone, Glibenclamide and Naproxen Sodium in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma by RP-HPLC. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 55, p. 1022-1029, 2008.

TAYLOR, T. Reversed-phase HPLC mobile-phase chemistry – explained. **LC-GC North America**, v. 32, n. 11, 2014.

TROY, D.N. (Ed.). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2393 p.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VENKATESH, P.; HARISUDHAN, T.; CHOUDHURY, H.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N.R. Simultaneous estimation of six anti-diabetic drugs - glibenclamide, gliclazide, glipizide, pioglitazone, repaglinide and rosiglitazone: development of a novel HPLC method for use in the analysis of pharmaceutical formulations and its application to human plasma assay. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 1043–1048, 2006.

VIANA, I.M.O.; LIMA, P.P.R.; SOARES, C.D.V.; FERNANDES, C. Simultaneous determination of oral antidiabetic drugs in human plasma using microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 96, p. 241-248, 2014.

VLCKOVÁ, H.; SOLICHOVÁ, D.; BLÁHA, M.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples — Critical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 301-308, 2011.

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 17 jun, 2015.

YOSHIDA, H.; MORITA, I.; MASUJIMA, T.; IMAI, H. A direct injection method of plasma samples onto a reverse phase column for the determination of drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 2287-2290, 1982.

YUZUAK, N.; OZDEN, T.; EREN, S.; OZILHAN, S. Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS. **Chromatographia Supplement**, v. 66, p. 165-168, 2007.

ZHONG, G.; BI, H.; ZHOU, S.; CHEN, X.; HUANG, M. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1462–1471, 2005.

ANEXO A – Certificados de participação no Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins – SIMCRO, 2014.



Certificado de Apresentação

O SIMCRO atesta que o trabalho intitulado

DETERMINAÇÃO DE SULFONILURÉIAS EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO CLAE COM COLUNAS RAM E DE NÚCLEO FUNDIDO

submetido pelos autores

JULIANA V. FERREIRA, GÉRSO A. PIANETTI, CHRISTIAN FERNANDES

foi apresentado como pôster no dia 6 de Setembro, durante o Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, realizado de 04 a 06 de Setembro de 2014 em Campos do Jordão (SP), Brasil.

[Signature]
Comitê Científico
SIMCRO 2014

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRÁFIA E TÉCNICAS AFINS

ANEXO B – Certificados de participação no Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SIMCIFAR, 2014.



Certificado

Certificamos que o resumo INJEÇÃO DIRETA DE SULFONILUREIAS EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO CLAE BIDIMENSIONAL EM MODO *BACKFLUSH*, dos autores FERREIRA, J.V.; PIANETTI, G.A.; FERNANDES, C., foi apresentado por Juliana Veloso Ferreira durante sessão de painéis no Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR 2014) realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no período de 28 a 30 de agosto de 2014, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2014.

Prof. Márcio de Matos Coelho
Comissão Organizadora

Ana Luiza Chaves Maia
Comissão Organizadora