

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

IARA MAÍRA DE OLIVEIRA VIANA

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA
HUMANO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM SORVENTE EMPACOTADO E
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Belo Horizonte - MG

2014

IARA MAÍRA DE OLIVEIRA VIANA

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM PLASMA
HUMANO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM SORVENTE EMPACOTADO E
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares – UFMG

Co-orientador Prof. Dr. Christian Fernandes – UFMG

Belo Horizonte - MG

2014

V614d Viana, Iara Máira de Oliveira..
Determinação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano empregando microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida de alta eficiência / Iara Máira de Oliveira Viana. – 2014.
104 f. : il.

Orientadora: Cristina Duarte Viana Soares.

Co-orientador: Christian Fernandes.

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

1. Agentes hipoglicêmicos – Teses. 2. Diabetes mellitus – Teses. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 4. Microextração – Teses. 5. Plasma humano – Teses. 6.. Validação de método – Teses. 7. Tecnologia farmacêutica – Teses. I. Viana-Soares, Cristina Duarte. II. Fernandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



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

U F M G

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Determinação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano empregando microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida de alta eficiência”

IARA MAÍRA DE OLIVEIRA VIANA

Dissertação submetida à Banca 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.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Christian Fernandes – Orientador*

UFMG

Profª. Adriana Ferreira Faria

UFMG

Profª. Flávia Dias Marques Marinho

UFOP

* Orientador designado para esta sessão em substituição ao titular, Cristina Duarte Vianna Soares, devido a ausência justificada.

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2014.

Dedico o título de mestre

Ao meu noivo Samuel (Paixão), que mesmo distante vivenciou de muito perto meu percurso.

Aos meus pais, Iranil e Gilmar, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram nas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dra. Cristina Duarte Vianna Soares por me receber tão prontamente como sua aluna, pela sua atenção e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Christian Fernandes pela colaboração técnica e prática, que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho.

Ao colegiado de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela cordialidade com que sempre me receberam e a CAPES pelo suporte.

A Prof^a Lucy por consentir que as amostras de sangue fossem coletadas no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, bem como por aceitar ser colaboradora nessa etapa da pesquisa.

Aos amigos do LCQ Camila, Carlos, Diego, Fernando, Ingrid, Isabela, Jéssica, Juliana Baratta, Juliana Brêtas, Juliana V., Laura, Léo, Luciano, Mariana, Mateus, Naialy, Paula Chellini, Paula Lima, Paula Enéas, Pedro, Rachel, Ricardo, Taízia, Tiago, Vinícius pelo ótimo convívio e ajuda na operação dos equipamentos. Em especial, agradeço a Laura por me mostrar todo o laboratório e me auxiliar nas primeiras análises com os fármacos antidiabéticos.

A Juliana Brêtas e ao CEBIO pela doação de amostras de plasma humano. Além disso, agradeço a Ju pelas nossas conversas e dicas sobre validação de método bioanalítico.

Ao Márcio, do Laboratório de Hematologia, por coletar as amostras de todos os voluntários, com muita boa vontade e bom humor.

A todos os voluntários dessa pesquisa. Em especial, ao meu pai, às minhas irmãs Karina e Camila, ao meu cunhado Juninho e à amiga Júlia, que se deslocaram até a UFMG só para me ajudar. Também agradeço especialmente: ao Luciano, ao Mateus, à Naialy e à Patrícia Amaral, por serem sempre tão solícitos; e ao Prof.

Christian, à Paula Chellini, ao Diego, à Juliana V., ao Mateus e à Taízia pela coragem e participação nas coletas.

Ao Diego, a Ingrid e a Paula Lima, pela participação na execução de alguns experimentos.

A Maria Aparecida M., Altino J., Sylvain Tranchand e Mariel Costa da Allcrom pela doação generosa da coluna Kinetex e dos filtros de linha físico KrudKatcher utilizados nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ary Correa Junior e a minha irmã Camila, pela cortesia da doação de ponteiras e tubos eppendorfs.

Aos meus pais, irmãs e cunhados pelo apoio incondicional, e por serem meus melhores amigos e companheiros. Com certeza essa trajetória seria muito mais difícil sem a ajuda de vocês.

Ao Paixão (Samuel) por estar sempre ao meu lado, me ajudando e dando forças para continuar. Muito obrigada por entender minha ausência e me esperar concluir esta etapa.

A todos meus amigos e familiares pelo apoio e por acreditarem em mim. Obrigada Leila e Vivian pelas dicas sobre a prova de seleção, pelo empréstimo de material para estudo e, principalmente, pela torcida tão otimista.

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada: os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano. Por um lado é desaparecimento, e por outro lado é renascimento. Assim somos nós. Voltar é impossível na existência. Você pode ir em frente e se arriscar: tornar-se oceano.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada pela produção insuficiente de insulina ou pela incapacidade de utilização efetiva de toda a insulina produzida pelo pâncreas. O tratamento inicial da diabetes mellitus tipo 2, que é o tipo mais comum da doença, consiste basicamente em mudanças no estilo de vida, com alteração na dieta alimentar e exercícios físicos. Entretanto, devido ao caráter progressivo da doença, é comum a prescrição de medicamentos orais para controle da glicemia. As sulfoniluréias são fármacos que tem sido amplamente utilizados no controle da glicemia. Nesse estudo, desenvolveu-se e validou-se um método simples usando microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta para determinação simultânea de três fármacos antidiabéticos orais da classe das sulfoniluréias (clorpropamida, gliclazida e glimepirida) em plasma humano. A glibenclamida, outra sulfoniluréia, foi utilizada como padrão interno. Um planejamento fatorial fracionário e um planejamento fatorial completo foram aplicados para avaliar os parâmetros que afetam as etapas de extração e dessorção, respectivamente. Todos os parâmetros da etapa de extração (pH, volume da amostra, diluição da amostra e número de ciclos de aspiração/ejeção) e da etapa de dessorção (porcentagem de acetonitrila no solvente de eluição e números de ciclos de aspiração do solvente de eluição através do cartucho) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando a recuperação foi usada como resposta. O método desenvolvido permitiu o uso de pequenos volumes de amostra e solventes. Os planejamentos experimentais realizados auxiliaram na escolha racional das melhores condições para cada parâmetro e na obtenção de recuperação e sensibilidade satisfatórias. A rápida e eficiente separação entre os fármacos foi possível pelo uso de coluna com partículas de núcleo fundido (tempo de corrida 2,2 min). Esse método foi validado mostrando seletividade, precisão, exatidão e linearidade nas faixas de 1,0-50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para clorpropamida, 1,0-10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliclazida e 0,1-1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glimepirida. Finalmente, o método validado foi aplicado em análises de amostras de plasma humano contendo os três analitos testados.

Palavras-chave: antidiabéticos orais, coluna com partículas de núcleo fundido, microextração em sorvente empacotado, planejamento experimental.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by the insufficient production of insulin or by the inability of the body to effectively use all the insulin which is produced by the pancreas. The initial treatment of the mostly common type 2 diabetes mellitus consists in changes in lifestyle, mainly in diet and physical exercises. However, due to the progressive feature of the disease the prescription of oral drugs to control the glycemia is a common practice. The sulfonylureas drugs have been largely used for the glycemic control. In this study, a simple method was developed and validated using microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the simultaneous determination of three oral antidiabetic drugs of the class of sulfonylureas (chlorpropamide, gliclazide e glimepiride) in human plasma. Glibenclamide, another sulfonylurea, was used as internal standard. A fractional factorial planning and a complete factorial planning were applied to evaluate the parameters that affect the stages of extraction and desorption, respectively. Every parameter of the extraction stage (pH, sample volume, sample dilution and number of aspiration/ejection cycles) and of the desorption stage (acetonitrile percentage in the elution solvent and the number of cycles of aspiration of the elution solvent through the cartridge) were statistically significant ($p < 0.05$) when the recovery was used as the measurement. The developed method allowed the use of small sample and solvent volumes. The performed experimental planning helped the rational choice of the best conditions for each parameter in order to obtain satisfactory recovery and sensitivity. The fast and efficient separation of the drugs was possible with the use of a fused-core particles column (run time of 2.2 min). This method was validated showing selectivity, precision, accuracy and linearity in the linear ranges of $1.0\text{-}50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ for chlorpropamide, $1.0\text{-}10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ for gliclazide and $0.1\text{-}1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ for glimepiride. Finally, the validated method was applied for the analysis of human plasma samples containing the three tested analytes.

Keywords: oral antidiabetic drugs, fused-cored particles column, microextraction by packed sorbent, experimental design.

LISTA DE FIGURAS

- 1 Estrutura química das sulfoniluréias, mostrando o anel da arilsulfoniluréia e os grupos substituintes da clorpropamida (CL, representada por A), gliclazida (GZ, representada por B), glimepirida (GM representada por C) e glibenclamida (GB, representada por D).....21
- 2 Fibra ótica de sílica fundida montada na ponta da agulha acoplada à seringa para ser utilizada em SPME [Vas e Vekey, 2004].....30
- 3 Dispositivo utilizado em MEPS destacando o cartucho de microextração inserido na agulha [Abdel-Rehim, 2010].....32
- 4 Procedimento ilustrativo de preparo de amostra utilizando a técnica MEPS evidenciando as etapas e suas ações [Abdel-Rehim, 2004].....34
- 5 Micrografia de partículas de núcleo fundido de 2,7 μm utilizadas como fase estacionária de colunas cromatográficas analíticas [Salisbury et al. 2010].....46
- 6 Coloração das amostras de plasma hemolisado (H, Ha e Hb) e fração de plasma branco normal (N) usado no preparo de Ha e Hb, que por sua vez foram utilizadas no teste seletividade (Ha, plasma hemolisado diluído com plasma branco na proporção 1:10; Hb, plasma hemolisado diluído com plasma branco na proporção 1:20).....59
- 7 Cromatogramas obtidos pela injeção da solução padrão contendo 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fármaco em acetonitrila: água (4:1). A mesma solução foi injetada alterando apenas a frequência de aquisição de dados / tempo de resposta (em que, F10 corresponde a 10 Hz/0,5 s e F20 a 20 Hz/0,1 s). Em (A) observa-se a separação cromatográfica entre os fármacos e, em (B), o ruído da linha de base.....63
- 8 Aspecto de amostras de plasma humano contendo clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100 μL) após adição de diferentes soluções pH 3,0 (300 μL).....66
- 9 Gráficos de pareto obtidos pelo PFF 2^{4-1} mostrando as variáveis (x_1, x_2, x_3, x_4) que afetam a etapa de extração dos antidiabéticos orais.....69
- 10 Gráficos de pareto obtidos pelo PFC 2^2 mostrando as variáveis (y_1 e y_2) que afetam a etapa de dessorção dos antidiabéticos orais.....71
- 11 Curva de níveis obtida através do PFC 2^271
- 12 Cromatogramas do plasma branco, solução padrão e amostra de plasma humano fortificado a 100 ng mL^{-1} usados na avaliação do volume de amostra que permitiria adequada sensibilidade ao método.....72
- 13 Cromatogramas obtidos a partir de plasma branco e amostras de plasma fortificadas com os fármacos clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) para fins de teste seletividade.....75
- 14 Espectros UV obtidos de uma amostra fortificada com clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) no nível LIQ e os respectivos espectros obtidos pelas soluções padrão na concentração de CQB.....77
- 15 Cromatogramas das injeções da amostra branco, sendo a primeira injeção do branco antes da injeção do LSQ e a segunda e a terceira injeções do branco após a injeção do LSQ.....78
- 16 Cromatogramas da primeira injeção do branco e do LIQ (em que CL = clorpropamida, GZ = gliclazida, GM = glimepirida e GB = glibenclamida).....78

17 Cromatogramas obtidos na análise de três amostras de voluntários que fizeram uso dos fármacos antidiabéticos orais clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM).....85

LISTA DE TABELAS

1	Exemplos de sorventes utilizados em SPE e respectiva matriz para a qual são aplicados [Li et al. 2006].....	28
2	Métodos para quantificação de analitos em amostras biológicas preparadas pela técnica MEPS.....	37
3	Métodos para quantificação de fármacos antidiabéticos orais (clorpropamida, CL; gliclazida, GZ, e glimepirida, GM) em plasma humano preparado por diferentes técnicas.....	40
4	Condições cromatográficas do método desenvolvido e validado para determinação de clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) utilizando glibenclamida (GB) como PI.....	55
5	Variáveis e seus respectivos níveis do PFF 2 ⁴⁻¹ para otimização da etapa de extração por MEPS.....	56
6	Experimentos do PFF 2 ⁴⁻¹ para otimização da etapa de extração por MEPS.....	56
7	Variáveis e seus respectivos níveis do PFC 2 ² para otimização da etapa de dessorção por MEPS.....	57
8	Experimentos do PFC 2 ² para otimização da etapa de dessorção por MEPS.....	57
9	Níveis de concentração dos analitos clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) para validação bioanalítica por HPLC-UV.....	61
10	Resultados preliminares utilizando MEPS para extração de clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) a partir de plasma humano.....	65
11	Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2 ⁴⁻¹ e para cada fármaco antidiabético oral (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, glimepirida, GM e glibenclamida, GB).....	68
12	Cromatogramas do plasma branco, solução padrão 100 ng mL ⁻¹ e amostra de plasma humano fortificado a 100 ng mL ⁻¹ usados na avaliação do volume de amostra que permitiria adequada sensibilidade ao método.....	70
13	Parâmetros de linearidade obtidos para cada fármaco antidiabético oral (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, e glimepirida, GM).....	79
14	Resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão para os fármacos antidiabéticos orais (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, e glimepirida, GM).....	81
15	Recuperação da clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e do PI glibenclamida (GB) de acordo com o nível de concentração.....	82
16	Estabilidade dos fármacos clorpropamida (CL), glimepirida (GM) e gliclazida (GZ) em plasma humano.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
C_{max}	Concentração plasmática máxima
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DPR	Desvio padrão relativo
GB	Glibenclamida
GLP	Glipizida
GM	Glimepirida
GZ	Gliclazida
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência)
in	<i>Inch</i> (Polegada)
ISPEs	<i>Class-selective immuno-sorbents</i> (imunossorventes classe-seletivos)
LC-ED	<i>Liquid chromatography with electrochemical detection</i> (cromatógrafo a líquido com detector eletroquímico)
LC-UV	<i>Liquid chromatography with ultraviolet detection</i> (cromatógrafo a líquido acoplado a detector ultravioleta)
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> (cromatógrafo a líquido acoplado a detector por espectrometria de massas)
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
LSQ	Limite superior de quantificação
MEF	Metformina
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i> (microextração em sorvente empacotado)
MIPs	<i>Molecularly imprinted polymers</i> (polímeros molecularmente impressos)
PI	Padrão interno
PIO	Pioglitazona
PP	<i>Protein precipitation</i> (precipitação de proteínas)
p/v	Peso por volume
r^2	Coefficiente de determinação
SQR	Substâncias químicas de referência
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> (microextração em fase sólida)
t_{max}	Tempo correspondente ao pico da concentração plasmática
UV	Ultravioleta
UVVis/DAD	Detector ultravioleta-visível de arranjo de diodos
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Diabetes mellitus	18
2.2 Determinação de fármacos em fluidos biológicos e o preparo de amostra	23
2.2.1 Técnicas convencionais	25
2.2.2 Técnicas modernas	28
2.2.3 Determinação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano	39
2.3 Colunas cromatográficas empacotadas com partículas de núcleo fundido	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Materiais	49
4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR), matérias-primas e medicamentos	49
4.1.2 Reagentes e vidrarias	50
4.1.3 Amostras biológicas	50
4.1.4 Equipamentos e materiais	51
4.2 Métodos	52
4.2.1 Preparo de soluções	52
4.2.2 Desenvolvimento do método bioanalítico para determinação de CL, GZ, GM e GB em plasma humano	53
4.2.3 Validação do método bioanalítico	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas	62
5.2 Otimização das condições para o preparo de amostra por meio de MEPS	64
5.3 Validação do método bioanalítico	74
5.3.1 Seletividade	74
5.3.2 Efeito residual	77
5.3.3 Linearidade	79
5.3.4 Precisão e Exatidão	79

5.3.5 Recuperação	82
5.3.6 Estabilidade	83
5.4 Aplicação do método	84
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A	96
APÊNDICE B	97
APÊNDICE C	98
APÊNDICE D	99
APÊNDICE E	101

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica com alta e crescente prevalência em todo o mundo. Atualmente, a DM acomete aproximadamente 347 milhões de indivíduos, dos quais cerca de 90% apresentam a pessoas o tipo 2 da doença (DM2). A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é frequentemente detectada em crianças e é causada por uma total deficiência na produção de insulina. A DM2 é mais comum em adultos e decorre de uma produção e/ou utilização insuficiente de insulina. A DM2 se desenvolve de forma lenta e progressiva e seus sintomas iniciais são brandos. O diagnóstico geralmente ocorre quando danos graves já foram causados à saúde do paciente. Para evitar a evolução da doença, é importante que o tratamento comece de imediato e que o nível de glicose seja eficientemente controlado. Nesse tratamento são utilizados medicamentos por via oral e uma das principais classes de fármacos utilizados é a das sulfonilureias. As sulfonilureias são fármacos com eficácia e segurança bem estabelecidos, e por isso, são amplamente usados no tratamento da DM2^{1,2}.

Um dos problemas mais comuns quando se trata de uso de medicamentos via oral em pacientes com doenças crônicas é a adesão ao tratamento. O controle glicêmico em pacientes em uso de sulfonilureias só é possível se o paciente usar corretamente o medicamento. Por outro lado, o controle glicêmico pode não ser atingido se houver ineficácia do tratamento, o que pode advir de uma resistência após longo período de uso de medicamentos. Em qualquer uma das situações, é importante monitorar a concentração desses fármacos no plasma do paciente a fim de inferir criteriosamente sobre a baixa adesão ao tratamento ou sobre a necessidade de alteração no tratamento de paciente com glicemia descontrolada. Para isso, é conveniente utilizar um método analítico simples, preciso e com alto poder de detecção do fármaco em baixa concentração no plasma humano³.

A determinação de antidiabéticos orais em plasma humano tem importância fundamental na avaliação da concentração plasmática de pacientes em crise hipoglicêmica, bem como em estudos de farmacocinética, na avaliação da biodisponibilidade de novas formas farmacêuticas, e em estudos de bioequivalência para estabelecimento de novos medicamentos genéricos e similares³.

A análise de fármaco em matrizes complexas, tal como o plasma humano, compreende quatro etapas principais: extração do analito, separação de interferentes, detecção e tratamento dos dados obtidos. A etapa de extração, também denominada preparo de amostras, é a mais demorada e a que pode gerar um maior número de erros⁴.

As técnicas de extração a partir de matrizes complexas, mais utilizadas atualmente, são laboriosas, requerem grande número de etapas e necessitam de volumes consideráveis de amostras e solventes. Por isso, novas abordagens têm sido desenvolvidas. Dentre elas, a microextração em sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*) é uma técnica capaz de extrair fármacos presentes em matrizes biológicas com alta eficiência. Em comparação com as técnicas convencionais, a MEPS necessita de menores volumes de amostras e solventes, além de menor tempo de análise. Assim, reduzem-se o descarte de resíduos químicos no ambiente e a exposição dos analistas a solventes tóxicos e material biológico. Em adição, a simplicidade da técnica aliada ao pequeno número de etapas necessárias para a sua execução reduz o custo final das análises. Outra vantagem da técnica MEPS é a possibilidade de concentração dos analitos provenientes de amostras de plasma⁵.

Recentemente foram disponibilizadas comercialmente colunas cromatográficas contendo partículas de núcleo fundido, que possibilitam adequada separação cromatográfica e alta eficiência em curtos tempos de análise, reduzindo com isso também o gasto de solventes.

Além disso, o desenvolvimento de um único método, capaz de quantificar simultaneamente os três fármacos antidiabéticos orais, clorpropamida, gliclazida e glimepirida, permite avaliar amostras de pacientes diabéticos usuários de qualquer um dos fármacos com mais agilidade e praticidade.

Entretanto, não existem na literatura relatos de métodos analíticos para a identificação e quantificação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano empregando a MEPS e a CLAE com colunas contendo partículas de núcleo fundido.

Diante do exposto, é justificado o desenvolvimento de um novo método, simples e rápido, para quantificação simultânea dos fármacos antidiabéticos orais clorpropamida, gliclazida e glimepirida em plasma humano. O emprego de MEPS como técnica de preparo de amostra e uma coluna de núcleo fundido na separação cromatográfica é adequado para tal fim.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes mellitus

A DM é uma doença crônica com crescente prevalência em todo o mundo, constituindo problema de saúde pública não só pela sua alta prevalência, mas também pelas graves consequências que traz ao paciente². Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 347 milhões de pessoas no mundo tem diabetes e a expectativa é que, em 2030, a doença se torne a 7ª principal causa de morte¹. O crescente aumento da prevalência da DM pode ser explicado pelo aumento da expectativa de vida da população, associada a maior prevalência da obesidade e sedentarismo⁶.

A DM decorre da produção de insulina em quantidades insuficientes, ou da incapacidade do corpo em usar efetivamente toda a insulina que é produzida. Como a insulina é o hormônio responsável por regular a entrada de glicose nas células, logo a doença provoca um quadro de acúmulo de glicose no sangue ou hiperglicemia que, ao longo dos anos, pode levar a sérios danos nos sistemas cardiovascular, renal e nervoso, dentre outros^{1,7}.

Os principais órgãos afetados pela hiperglicemia são o coração, os vasos sanguíneos, os olhos, o fígado, os rins e os nervos. Por isso, o risco de doença cardíaca e acidente vascular cerebral é alto. Uma das complicações mais comuns originadas dos altos níveis de glicose no sangue é a neuropatia (danos nos nervos) que acomete principalmente os pés. Em seu estágio mais avançado, a neuropatia pode causar graves consequências como úlceras nos pés, infecções e até mesmo a necessidade de amputação do membro. A cegueira é outro recorrente dano causado pela hiperglicemia, sendo que cerca de um por cento de cegueira global pode ser atribuído à diabetes. Além disso, a DM é uma das principais causas de insuficiência renal e o risco de morte entre as pessoas com DM é pelo menos o dobro daquelas sem diabetes¹.

A DM pode ser classificada em diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes mellitus gestacional (DMG) e outros tipos específicos de diabetes.

A DM1, mais conhecida como insulino-dependente, é resultado da destruição das células beta do pâncreas e por isso geralmente leva a uma total deficiência na produção de insulina. A causa da DM1 é desconhecida até o momento e, portanto, sem possibilidade de prevenção. Os sintomas incluem poliúria, polidipsia (aumento anormal da sede), fome constante, perda de peso, alterações na visão e fadiga. A DM2 resulta da resistência do organismo à insulina e da sua produção insuficiente⁷. O terceiro tipo, DMG - mais frequentemente identificada através de exames no pré-natal do que pelo relato dos sintomas - tem sintomas semelhantes àqueles da DM2¹ e, até o momento, pouco se sabe a seu respeito⁷. Outros casos de diabetes decorrem de defeito genético com comprometimento do funcionamento da célula beta, ou alterações genéticas que afetam a ação da insulina, de doenças do pâncreas (como fibrose cística) e de indução por outros medicamentos⁷.

A DM2 é o tipo mais comum, correspondendo a cerca de 90% dos casos. Os sintomas são semelhantes aos da DM1, porém menos acentuados. Por isso, normalmente a doença é diagnosticada após vários anos, quando surgiram as complicações. Em geral, a DM2 se desenvolve em pessoas com excesso de peso e que levam uma vida sedentária, de modo que acomete principalmente adultos^{1,2,6}, contudo pode ser observada em crianças¹.

Uma dieta balanceada e exercícios regulares são as principais recomendações para o controle da glicemia principalmente por pessoas propensas à diabetes. Evitar o tabagismo e manter o peso normal também podem auxiliar na prevenção ou retardar o aparecimento da DM2^{1,8}. Entretanto, intervenções farmacológicas são frequentemente necessárias para manter o nível glicêmico sob controle. Mesmo assim, a monoterapia pode não ser suficiente para manter o nível de glicose recomendado após alguns anos. Então múltiplos fármacos podem ser associados, cada qual com um mecanismo de ação diferente⁸.

Em pessoas com DM1, o tratamento farmacológico consiste, usualmente, na administração de insulina injetável. Medicamentos orais não trazem grandes benefícios a esses pacientes, ao contrário do que acontece com pessoas com DM2, em que os medicamentos orais são amplamente prescritos e benéficos. Entretanto, a insulina também é necessária em pacientes com DM2, quando a doença se

encontra em estágio avançado e os medicamentos não resultam em concentrações plasmáticas adequadas de glicose^{1,8}.

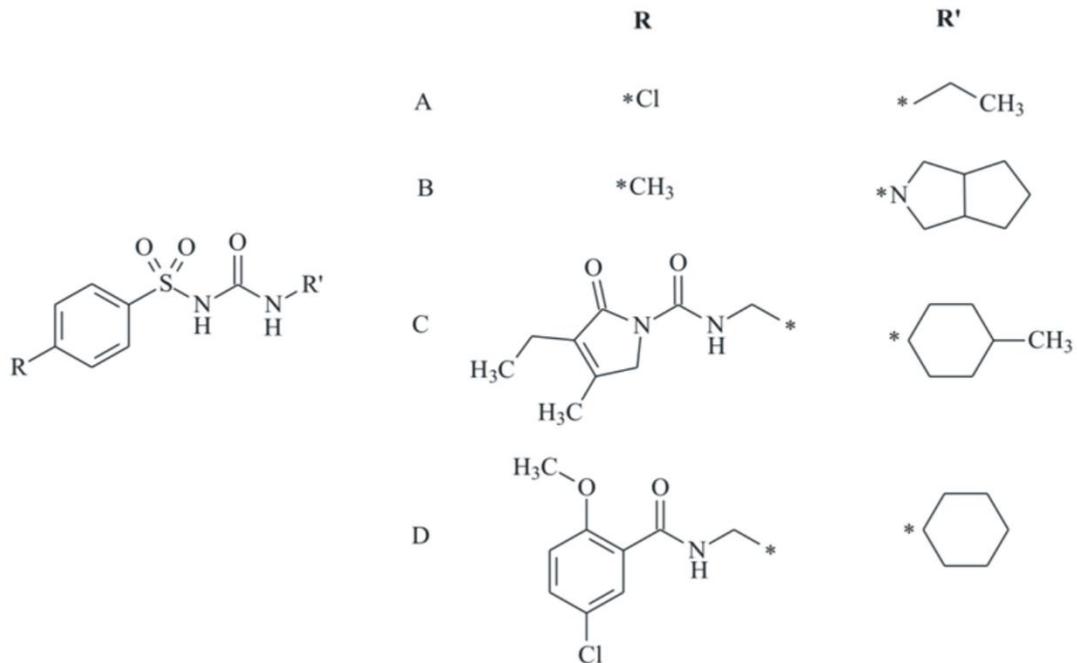
Inicialmente, o tratamento de pacientes com DM2 consiste em mudanças no estilo de vida e uso de metformina (MEF) por via oral (tratamento de primeira linha). A metformina é um medicamento da classe das biguanidas. Outros fármacos são necessários quando o tratamento de primeira linha não leva aos resultados esperados, situação bastante frequente em pacientes com DM2 devido ao caráter progressivo da doença². Nesse caso, o prescritor adiciona um fármaco secretagogo de insulina (como as sulfonilureias) ou doses moderadas de tiazolidinedionas (como exemplo, 30 mg de pioglitazona, PIO) ao tratamento⁸. Os secretagogos de insulina podem ser as sulfonilureias ou os inibidores da enzima dipeptidil peptidase. Entretanto, as sulfonilureias são os fármacos de primeira escolha quando o paciente passou por perda de peso ou possui teores glicêmicos muito elevados e representam a opção menor custo^{2,8}.

Os principais efeitos adversos causados pelas sulfonilurêias são a hipoglicemia e o aumento de peso. A hipoglicemia é menos frequente com o uso dos fármacos de última geração e/ou com o uso de medicamentos de ação prolongada que são administrados uma vez ao dia. Reações cutâneas, hematológicas ou hepáticas são raras⁹.

A grande vantagem da utilização das sulfonilureias é que são fármacos há muito tempo utilizados na terapêutica e, portanto, mostram eficácia e segurança bem estabelecidos. Apesar de apresentarem resposta com duração limitada, risco aumentado de hipoglicemia e levarem a um ganho de peso, as sulfonilureias continuam sendo amplamente usadas na terapêutica da DM2^{2,8}.

As sulfonilurêias tem estruturas químicas similares, constituídas de arilsulfonilureias substituídas (**Figura 1**). Incluem-se na primeira geração do grupo os fármacos clorpropamida (CL), tolazamida, acetohexamida e tolbutamida, enquanto na segunda geração estão a gliclazida (GZ), glimepirida (GM), glibenclamida (GB) (também conhecida como gliburida) e glipizida (GLP)¹⁰.

Figura 1 – Estrutura química das sulfoniluréias, mostrando o anel da arilsulfoniluréia e os grupos substituintes da clorpropamida (CL, representada por A), gliclazida (GZ, representada por B), glimepirida (GM representada por C) e glibenclamida (GB, representada por D).



De uma forma geral, todas as sulfonilureias tem praticamente a mesma eficácia, mas se diferem, principalmente, nas suas características farmacocinéticas¹¹. As antigas sulfoniluréias (CL e tolbutamida), comparativamente à dieta isolada, são eficazes, mas são responsáveis por maiores índices de hipoglicemia e ganho de peso. As novas sulfoniluréias (GZ, GM, GB, GLP), quando comparadas a placebos, melhoram os níveis de glicose após cerca de 13 semanas, sem aumentar a incidência de hipoglicemia. Entretanto, eventualmente podem causar aumento de peso nos seus usuários¹¹.

Apenas a GZ e a GB fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais e, portanto, estão disponíveis no Sistema Único de Saúde¹². Elas possuem eficácia, toxicidade e farmacocinética semelhantes². Entretanto, a hipoglicemia é mais frequente nos pacientes, principalmente idosos, em uso da GB do que de GZ¹¹.

As propriedades físico-químicas das sulfoniluréias também são semelhantes. Elas são moléculas muito mais solúveis em solventes menos polares (como metanol e acetonitrila) do que em água. CL, por exemplo, é solúvel em água em pH 6 (2,2 mg mL⁻¹), porém é praticamente insolúvel em água em pH 7,3. Por outro lado, CL é

moderadamente solúvel em clorofórmio e pouco solúvel em éter e benzeno. Similarmente, GB é pouco solúvel em água, mas é solúvel em solventes orgânicos¹³.

As sulfoniluréias CL, GZ, GM e GB apresentam valores de coeficiente de partição octanol/água relativamente altos (log P: 2,27 para CL, 2,6 para GZ, 3,5 para GM e 4,7 para GB). Por conseguinte, são moléculas apolares e tem afinidade por sorventes de cromatografia em fase reversa (C₈ e C₁₈, por exemplo)¹⁴.

Todas possuem valor de pKa próximo a 5,0 (CL 4,71, GZ 6,07, GM 5,1, GB 5,11)¹⁵. Outra semelhança são seus espectros de absorção em ultravioleta (UV). Pico de absorção em UV próximo a 230 nm pode ser observado para CL, GZ, GM e GB¹⁶.

As concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) das sulfoniluréias GM e GB são inferiores àquelas da CL e GZ quando se administram doses usuais de cada fármaco.

Bakare *et al.* (1994) e Odunola *et al.* (2007) obtiveram resultados de C_{max} para a CL de $30.640 \pm 3.200 \text{ ng mL}^{-1}$ após a administração de 250 mg e em um tempo máximo (t_{max}) de cerca de 1,26 h^{17,18}. Conforme descrito no livro Clarke's (2004), a concentração terapêutica usual em plasma humano e a dose da CL são, respectivamente, 30.000 – 250.000 ng mL^{-1} e 100 – 500 mg por dia¹⁶.

Para a GZ, Kim *et al.* (2003) relataram C_{max} de $4690 \pm 1380 \text{ ng mL}^{-1}$ após administração de comprimido contendo 80 mg de GZ. O t_{max} foi de $3,45 \pm 1,11 \text{ h}$ ¹⁹. Nesse mesmo trabalho são apresentados resultados de outro estudo (Glowka *et al.*, 1998), em que após administração da mesma dose de GZ foram encontrados valores semelhantes de C_{max} de $4560 \pm 630 \text{ ng mL}^{-1}$ e t_{max} de $4,10 \pm 0,44 \text{ h}$ ^{19,20}. Em outras referências, os valores para C_{max} são diferentes, porém muito próximos. Concentrações plasmáticas de 700 a 4900 ng mL^{-1} após 4 h da administração de dose única de 80 mg podem ser encontradas. A dose usual diária da GZ é de 40 a 320 mg¹⁶.

Pistos *et al.* (2005) observaram uma C_{max} média de 241,45 ng mL^{-1} e t_{max} de 2,92 h após administração de um comprimido contendo 4 mg de GM²¹. No livro Clarke's

(2004) é descrito que, após 2,1 h da administração de 4 mg de GM, pode ser encontrado cerca de $307,8 \text{ ng mL}^{-1}$ do fármaco no plasma humano. A dose indicada de GM é de até 4 mg por dia¹⁶.

No caso da GB, a concentração plasmática após administração de uma única dose de 5 mg do fármaco, no estudo de Niopas *et al.* (2002), foi igual a $167,7 \pm 63,4 \text{ ng mL}^{-1}$. O t_{max} encontrado foi de $3,6 \pm 2,3 \text{ h}$ ²². Tais resultados estão de acordo com o descrito em Clarke's (2004), no qual é relatado que após 3 h da administração de dose única de 5 mg de GB, concentrações plasmáticas entre $170 - 360 \text{ ng mL}^{-1}$ podem ser obtidas. A dose usual da GB é de 5 a 15 mg por dia¹⁶.

2.2 Determinação de fármacos em fluidos biológicos e o preparo de amostra

A determinação de fármacos em fluidos biológicos é fundamental no atual estágio de desenvolvimento de novos medicamentos. Estudos farmacocinéticos, necessários na avaliação do comportamento de um novo fármaco no organismo, demandam a utilização de métodos analíticos confiáveis. A comparação da liberação de fármacos no organismo por diferentes formas farmacêuticas, bem como a introdução de novos sistemas, como o de liberação transdérmica, também tornam necessária a utilização de métodos adequados. Além disso, métodos com boa detectabilidade são imprescindíveis na monitorização terapêutica, um procedimento muito comum para acompanhamento dos níveis plasmáticos de fármacos com baixo índice terapêutico. Ademais, técnicas analíticas confiáveis são exigidas em estudos de bioequivalência, nos quais se verifica a intercambialidade entre medicamentos referência, genéricos e similares³.

No entanto, a análise de fármacos e de seus metabólitos em amostras complexas, tais como plasma, urina, tecidos e leite apresenta algumas dificuldades, tendo em vista a complexidade destas matrizes. Uma grande diversidade de interferentes endógenos está presente, por exemplo, proteínas em plasma, soro, tecidos e leite e sais inorgânicos em urina²³. O soro e plasma contêm, por exemplo, aproximadamente 10.000 proteínas diferentes em uma concentração de $6 \text{ a } 8 \text{ g dL}^{-1}$, cerca de 3 mg mL^{-1} de sódio, $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de potássio, $15 \text{ a } 38,5 \text{ mg dL}^{-1}$ de ureia, dentre outras substâncias²⁴. Além disso, a dificuldade de extração em matrizes

complexas se deve à baixa concentração na qual frequentemente são encontrados os analitos de interesse²³. Desse modo, é necessário utilizar técnicas de extração que permitam a obtenção de amostras limpas e concentradas. Da mesma forma, é fundamental que a análise empregue técnicas de separação e detecção que tornem possível a identificação e quantificação dos analitos mesmo em concentrações reduzidas.

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica mais utilizada para a determinação de fármacos em insumos farmacêuticos, medicamentos e fluidos biológicos, por ser versátil e exigir, apenas a solubilização do analito na fase móvel. No entanto, quando matrizes complexas são utilizadas, é necessário um tratamento prévio das amostras, para remoção dos potenciais interferentes presentes. Caso contrário, macromoléculas endógenas podem ser retidas e até obstruir as colunas analíticas, ocasionando redução da vida útil do sistema cromatográfico. Além disso, para permitir uma adequada separação cromatográfica e detecção, durante a etapa de extração a amostra deve idealmente ser concentrada, diluída em solvente de força adequada e ajustada a um pH compatível com o sistema cromatográfico²⁴.

Com o preparo de amostras objetiva-se extrair o analito da matriz, remover potenciais interferentes, aumentar a concentração do analito e favorecer a detectabilidade, de modo a desenvolver um método robusto e reprodutível, que seja independente de variações na matriz²⁴. Várias técnicas têm sido empregadas buscando-se atingir estes objetivos. No entanto, ainda não há uma técnica que possua todas as características necessárias. De acordo com dados da literatura, 61% do tempo gasto e 30% dos erros introduzidos em uma análise correspondem à etapa de preparo de amostras⁴. Dessa forma, o preparo de amostra apresenta grande impacto na qualidade da análise e no seu custo²⁴.

As técnicas mais utilizadas para o preparo de amostras biológicas continuam sendo: a precipitação de proteínas (PP, do inglês *protein precipitation*) e a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*). Estas técnicas são muito laboriosas, têm alto consumo de solventes orgânicos e, além disso, expõem os analistas ao contato rotineiro com estes solventes e com material biológico²⁵. A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) apresenta algumas vantagens em

relação às técnicas citadas anteriormente, pois necessita de menor volume de solventes e permite melhor remoção de interferentes em matrizes complexas, com consequente isolamento do analito de interesse²⁶.

2.2.1 Técnicas convencionais

2.2.1.1 Extração líquido-líquido

A LLE baseia-se na solubilidade relativa das substâncias presentes na amostra em dois líquidos imiscíveis. É uma técnica simples e de fácil execução, necessitando apenas de solventes puros (disponíveis comercialmente) e funil de separação ou tubos de centrífuga. Em geral, os analitos estão presentes em uma matriz líquida aquosa, à qual é adicionado um solvente orgânico imiscível com a água. Ocorre então a partição do soluto entre os dois solventes^{26,27}. Quanto maior for a afinidade do analito pelo solvente de extração, que geralmente corresponde à fase orgânica, maior será a extração. Além disso, a eficácia do processo dependerá da proporção das fases e do número de extrações²⁸.

Em algumas situações o ajuste do pH é um fator importante para aumentar a afinidade do analito pelo solvente de extração com consequente aumento da sua recuperação. Isso acontece porque, ao alterar o pH, pode-se prevenir a ionização de ácidos ou bases. A adição de sais inorgânicos à mistura dos solventes também é uma alternativa que favorece a extração dos analitos na medida que facilita a separação entre as fases. Além disso, a adição de sais neutros é um recurso útil na extração de solutos não-polares imiscíveis em solventes orgânicos, uma vez que diminui a solubilidade desses solutos não-polares na fase aquosa. Outra forma de aumentar a extração dos analitos é proporcionar a formação de complexos lipossolúveis com o uso de par iônicos (quando os analitos são solutos ionizáveis) ou agentes quelantes (quando os analitos são metais)^{27,28,29}.

O procedimento de preparo de amostra por LLE apresenta desvantagens consideráveis como a necessidade de utilização de grandes volumes de amostra e de solventes, que aumenta a geração de resíduos tóxicos e a exposição do analista a materiais com risco biológico e químico (solventes tóxicos e inflamáveis). Além

disso, a técnica envolve um grande número de etapas, o que torna o processo demorado e aumenta a probabilidade de erros. Ademais, a LLE é uma técnica de baixa seletividade, por meio da qual, dificilmente, consegue-se retirar a maioria dos interferentes, o que causa efeitos de matriz em sistemas com detecção por espectrometria de massas. Em geral, a recuperação dos analitos pelo emprego da LLE é baixa e variável, principalmente quando se trata de analitos polares. Para evitar a adição de interferentes devem ser utilizados solventes ultrapuros, o que pode encarecer o processo. Em adição, pode ocorrer a formação de emulsões, o que torna a extração mais lenta e tediosa. Outras desvantagens são a possibilidade de adsorção dos analitos à vidraria, a decomposição de compostos instáveis termicamente durante a etapa de pré-concentração e a dificuldade de automação do processo²⁸.

2.2.1.2 Precipitação de proteínas

A PP é uma técnica convencional muito empregada no preparo de amostra devido à sua simplicidade. Essa técnica tem como fundamento a desnaturação das proteínas da matriz biológica na presença de altas temperaturas, solventes orgânicos (acetonitrila ou metanol, dentre outros), sais, ácidos ou bases fortes²⁷. Os ácidos e bases desnaturam a proteína ao alterar seu estado de ionização. Os sais, por sua vez, reduzem a hidratação das moléculas, tornando-as menos solúveis. Os solventes orgânicos interferem tanto nas interações hidrofóbicas intramoleculares das proteínas quanto reduzem sua hidratação²⁴.

Após a desnaturação das proteínas, a amostra é agitada e centrifugada para separação das fases, sendo o sobrenadante utilizado na quantificação da(s) substância(s) de interesse. Essa técnica é, demorada, por necessitar de várias etapas, além de grandes volumes de amostra e solventes²⁷.

2.2.1.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) é uma técnica de separação líquido-sólido consagrada. A SPE emprega sorventes empacotados em discos ou em cartuchos (nas formas de cilindro ou seringa, que são fixados entre 2

filtros microporosos)^{26,28,30}. Usualmente o cartucho é constituído de fases estacionárias semelhantes às empregadas em cromatografia líquida de baixa pressão (sendo comumente usados sorventes de fase reversa), portanto, os mecanismos de separação em SPE são os mesmos da cromatografia líquida²⁶. O principal mecanismo cromatográfico envolvido consiste na partição do analito entre a fase estacionária (sorvente) e a fase móvel (matriz da amostra diluída em um tampão com fraca força de eluição), onde os analitos que tiverem mais forte interação intermolecular (seja ela do tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo, interação iônica e/ou força de van der Waals) com o sorvente serão os mais retidos³⁰.

Os cartuchos podem conter entre 50 a 500 mg de material sorvente e o tamanho da partícula varia entre 40 a 60 μm ²⁸. A fase estacionária pode ser carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (florisil), fases quimicamente ligadas, como octadecilsilano (C_{18}) e polímeros (**Tabela 1**). Ademais, para aumentar a seletividade da extração, vários desses sorventes podem ser combinados em um único cartucho^{27,28}. Devido a essa grande gama de fases estacionárias disponíveis comercialmente a técnica é aplicável na determinação de analitos com diversas estruturas químicas e polaridades. Atualmente, têm sido pesquisados novos sorventes que permitam maior eficiência de extração, inclusive de analitos muito polares a partir de matrizes aquosas. Novas fases estacionárias como imuno-sorventes classe-seletivos (ISPEs do inglês *class-selective immuno-sorbents*) e polímeros molecularmente impressos (MIPs do inglês *molecularly imprinted polymers*) tem sido sintetizados visando aumentar a seletividade durante a extração e, conseqüentemente, simplificar as etapas de limpeza e detecção³¹.

O procedimento de extração constitui-se, basicamente, das seguintes etapas: (a) ativação e condicionamento do sorvente com solvente adequado; (b) aplicação da amostra, para a extração dos analitos e de alguns interferentes; (c) limpeza do cartucho para remoção de interferentes menos retidos que o analito; e (d) eluição, ou dessorção dos analitos do sorvente²⁸.

Tabela 1 – Exemplos de sorventes utilizados em SPE e respectiva matriz para a qual são aplicados [Li et al. 2006]³⁰.

Sorvente	Matriz da amostra
Não-polar: C ₁₈ , C ₈ , C ₆ , C ₄ , C ₂ , PH, CH, CN	Aquosa
Polar: CN, Si, NH ₂ , 2OH	Não-polar
Troca catiônica: SCX, PRS, CBA	Aquosa
Troca aniônica: SAX, NH ₂ , PSA, DEA	Aquosa
Misturas: C ₈ + SCX, C ₈ + SAX, Oasis HLB*	Aquosa

* Fabricado por Waters (Milford, USA).

A SPE é uma técnica que permite alta recuperação dos analitos. Contudo, geralmente, necessita de grandes volumes de amostra e solvente(s). O uso de grandes volumes de solventes na etapa de dessorção pode levar à diluição da amostra e, conseqüentemente, à necessidade de etapas adicionais como a evaporação do solvente e reconstituição do resíduo em menor volume de solvente(s). Nessa situação o tempo de análise e custo serão aumentados³². Outra desvantagem é que cerca de 100 mg ou mais de material sorvente são normalmente empregados em SPE. A maior quantidade de fase sólida associada à maior quantidade de amostra poderia provocar efeitos residuais, e, portanto, a reutilização dos cartuchos em SPE não é recomendada. Como consequência, tem-se o aumento do custo por análise^{33,34}.

2.2.2 Técnicas modernas

O desenvolvimento de novas técnicas para extração em matrizes complexas tem caminhado no sentido da redução do consumo de amostras e de solventes, a fim de se evitar, ao máximo, a produção de resíduos tóxicos que podem ser prejudiciais tanto ao meio ambiente, quanto à saúde humana. O menor consumo de amostras e de solventes também reduz a exposição do analista. Para atender a essa demanda da química verde, têm sido desenvolvidas e pesquisadas diversas técnicas miniaturizadas.

Atualmente, se tem buscado novas fases estacionárias que possam aumentar a recuperação das substâncias de interesse, geralmente presentes em concentrações

muito baixas em amostras biológicas, e principalmente, objetivando aumentar a seletividade do processo de extração. Uma técnica de extração em matriz complexa seletiva é capaz de eliminar de forma mais eficiente os interferentes da análise, e com isso, permitir um aumento na vida útil do sistema cromatográfico.

Outra tendência moderna é a automatização das técnicas de preparo de amostras, que objetivam eliminar erros humanos de manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise e, conseqüentemente, o risco de contato com substâncias prejudiciais à saúde, além de reduzir o tempo de análise²⁸.

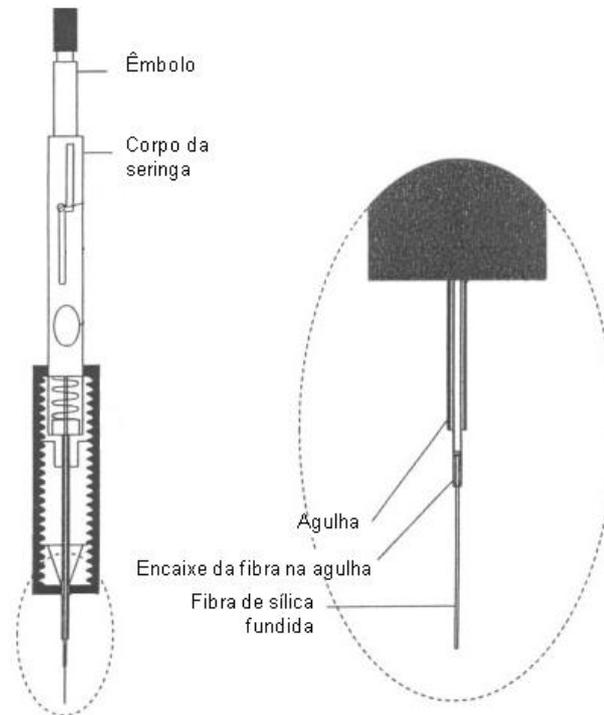
2.2.2.1 Microextração em fase sólida

Na microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*) uma fibra ótica de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um sorvente sólido constitui a fase extratora. Essa fibra é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa para a extração dos analitos, conforme **Figura 2**. A extração em SPME é baseada no princípio cromatográfico de partição entre gás-líquido ou líquido-líquido. Essa partição entre a fase estacionária da fibra e a amostra ocorre até que o equilíbrio seja atingido³⁵. Inúmeros parâmetros podem impactar na eficiência da extração e, portanto, devem ser otimizados, dentre os quais pode-se destacar o tipo de fibra utilizado, a espessura do filme, a agitação da amostra, o tempo e temperatura de extração, volume de solvente orgânico utilizado, pH e a força iônica dos analitos da amostra^{3,36,37}.

Durante o procedimento de análise, a fibra pode ser apropriadamente posicionada acima da amostra ou ser mergulhada na solução da amostra. No primeiro caso, tem-se a chamada técnica *headspace*, na qual a amostra é aquecida e as substâncias voláteis são adsorvidas na fibra ótica que é posta em contato com o vapor da amostra. Após a extração, os analitos presentes na fibra são geralmente dessorvidos termicamente pela sua introdução no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás. No segundo caso, a fibra é imersa na amostra, mantida sob agitação por tempo determinado para que a extração ocorra. Usualmente, os analitos são concentrados por 2 a 15 min e em seguida a agulha é recolhida para

dentro da seringa. Os analitos são então dessorvidos pelo eluente, que geralmente consiste na própria fase móvel usada na separação cromatográfica²⁸.

Figura 2- Fibra ótica de sílica fundida montada na ponta da agulha acoplada à seringa para ser utilizada em SPME [Vas e Vekey, 2004]³⁶.



A técnica é aplicável principalmente às substâncias orgânicas voláteis e semi-voláteis e termicamente estáveis, sendo essas dessorvidas e determinadas por cromatografia gasosa²⁸. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC do inglês *high performance liquid chromatography*), normalmente com detecção por espectrometria de massas (MS), é utilizada quando os analitos são pouco voláteis ou são termolábeis. Uma câmara de dessorção especial (amostrador) pode ser utilizada para a remoção dos analitos antes da separação cromatográfica. Nesse caso, a própria fase móvel é, em geral, empregada como eluente e os analitos são transferidos diretamente para a coluna cromatográfica³⁶. Esse processo automatizado da SPME é denominado SPME *online*³¹.

A utilização da SPME no preparo de amostra permite o desenvolvimento de métodos mais práticos e rápidos do que aqueles em que utilizam-se a LLE e a PP. Na SPME, os analitos são absorvidos/adsorvidos na fibra e concentrados ao mesmo tempo,

consistindo em uma única etapa. Essa concentração é vantajosa, para a detecção posterior dos analitos. Além disso, ao usar a SPME obtêm-se extratos mais limpos e não há consumo de solventes na etapa de dessorção³⁶. Entretanto, as opções de fases estacionárias disponíveis comercialmente são limitadas e as fibras podem ser rompidas ou perder o revestimento à medida que são utilizadas. Ademais, o processo de produção das fibras leva a uma grande variação lote a lote, o que compromete a reprodutibilidade e robustez dos métodos analíticos³⁵.

2.2.2.2 Microextração em sorvente empacotado

Uma nova abordagem, denominada MEPS, foi recentemente desenvolvida por Abdel-Rehim⁵. A MEPS é uma técnica de extração em fase sólida que pode ser conectada ao cromatógrafo a gás ou a líquido sem modificações no equipamento. Esta técnica é uma miniaturização da SPE convencional. Ambas são eficientes na remoção de interferentes em matrizes complexas e no isolamento e na concentração de analitos. Entretanto, com a MEPS é possível reduzir a quantidade de reagentes e amostras, o tempo necessário por análise e o número de etapas. Além disso, o dispositivo de MEPS pode ser reutilizado de 40 a 100 vezes para amostras de plasma, enquanto que, na SPE convencional, o cartucho de extração é utilizado uma única vez. Dessa forma, esta técnica moderna representa uma alternativa eficiente e de custo reduzido em relação às técnicas convencionais, aplicável mesmo a pequenas quantidades de amostra³⁸.

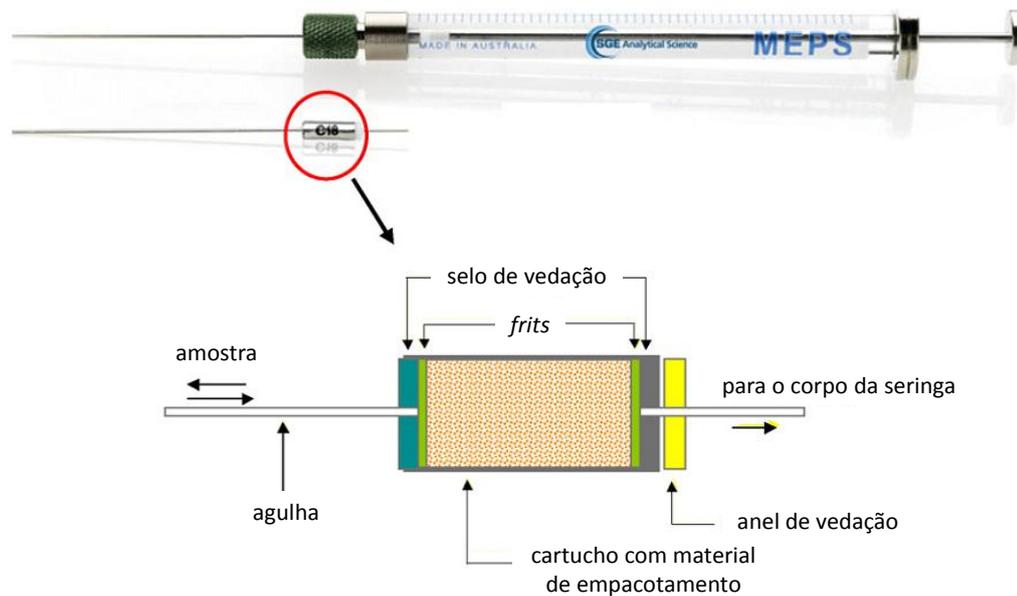
A técnica MEPS apresenta grande flexibilidade por permitir a análise de compostos polares, apolares, neutros e iônicos em decorrência da variedade de fases estacionárias disponíveis comercialmente: fases normal (sílica), reversa (C₂, C₈ e C₁₈), de troca iônica (aniônica e catiônica) e modo misto (C₈ associado a troca catiônica). Além destas, foram descritas na literatura fases com meios de acesso restrito, interação hidrofílica, carbono, copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, MIPs ou sorvente orgânico monolítico^{38,39}.

Outra vantagem é que esta técnica possibilita a utilização de amostrador automático do tipo CTC PAL (Crelab, Knivsta, Suécia). Nessa situação, após o procedimento de limpeza, a amostra é diretamente introduzida no equipamento onde ocorrerá a

separação e detecção dos analitos. Para acelerar o procedimento, o sistema pode ser ajustado de modo que a etapa de extração pelo MEPS seja realizada simultaneamente à análise em cromatógrafo a líquido acoplado a detector por espectrometria de massas (LC-MS/MS do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*), ou seja, à medida que uma amostra é extraída a amostra anterior é analisada no cromatógrafo³⁹.

A extração por MEPS segue o mesmo princípio da SPE, sendo a principal diferença entre as técnicas o dispositivo utilizado. Ao contrário do aparato da SPE, o aparato da MEPS pode conter apenas cerca de 1 ou 2 mg de material sorvente, acondicionado em um cartucho com filtros de polietileno em ambos os lados, o qual está inserido em uma agulha fixa no corpo da seringa (**Figura 3**)⁴⁰.

Figura 3 – Dispositivo utilizado em MEPS destacando o cartucho de microextração inserido na agulha [Abdel-Rehim, 2010]³⁸.



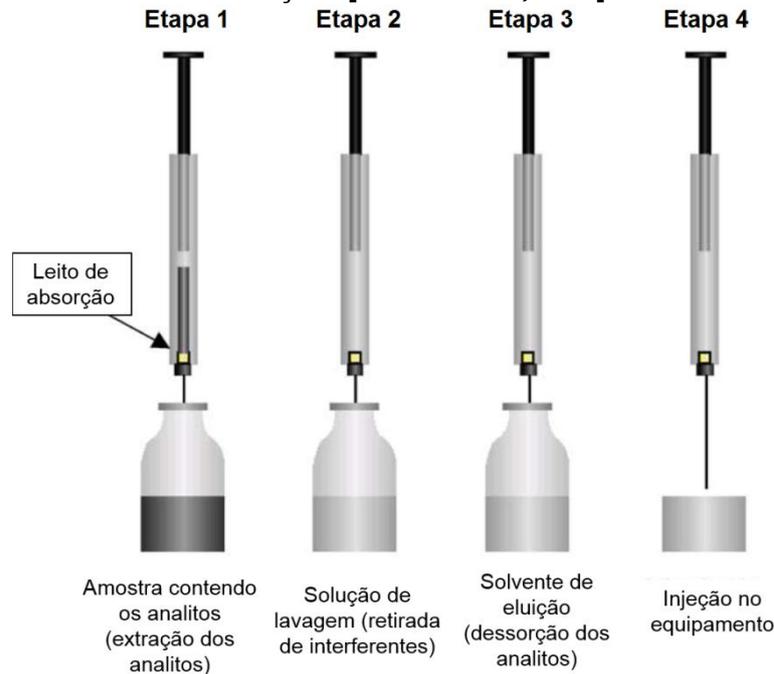
A pequena quantidade de material sorvente inserido no cartucho possibilita a utilização de apenas poucos microlitros de amostra e solventes por análise, enquanto que em SPE são necessários volumes da ordem de mililitros. O volume de amostra empregado em MEPS pode variar de 10 μL a volumes relativamente grandes, como 1000 μL ³⁸. Além disso, a menor quantidade de material sorvente proporciona maior eficácia na lavagem do cartucho com pequena quantidade de solvente. Assim, o efeito residual entre as extrações pode ser eliminado³². Esta técnica também possibilita a concentração de amostras diluídas, pela realização de

vários ciclos das etapas de aspiração e ejeção. Outra vantagem importante da MEPS é a redução do tempo de análise de amostras em matrizes biológicas, uma vez que a etapa mais demorada do processo analítico, o preparo da amostra, é simplificada³⁸. Na extração com MEPS, por exemplo, não são necessárias as etapas de evaporação de solventes e transferência da amostra. O menor número de etapas, além de reduzir o tempo de análise, evita a perda do analito e favorece a reprodutibilidade do processo.

As etapas do processo de preparo de amostra em MEPS são também semelhantes às da técnica SPE (**Figura 4**). A principal diferença é que o sorvente do MEPS precisa ser limpo e recondicionado antes de sua reutilização na extração seguinte, enquanto o cartucho SPE é descartado após as quatro etapas básicas do procedimento.

Durante o desenvolvimento de método de extração utilizando MEPS é importante que as variáveis sejam otimizadas objetivando obter adequada eficiência de extração e limpeza da amostra. Vários testes podem ser necessários devido ao grande número de parâmetros envolvidos no processo, acarretando em considerável consumo de solventes, amostra, tempo, custo, e ademais, comprometendo a simplicidade, rapidez e economia de materiais anteriormente referidos. Dessa forma, verificou-se em alguns trabalhos que um planejamento experimental tem sido utilizado na otimização da etapa de extração⁴¹. Com o objetivo de avaliar simultaneamente vários dos parâmetros que afetam a recuperação dos analitos pela técnica MEPS, Magiera *et al.* (2013), empregaram um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman na etapa de otimização de método para análise de fármacos anti-inflamatórios não esferoidais em urina humana. Neste estudo, apenas 11 experimentos foram realizados, enquanto que para um planejamento completo 128 experimentos seriam necessários. Todos os parâmetros avaliados (natureza do sorvente, pH e volume da amostra, tipo e pH do eluente, volume de eluição, tempo para secagem do sorvente e solvente de lavagem) foram significativos. Os autores ressaltaram que a aplicação do planejamento experimental foi útil na redução do número de experimentos necessários para otimização e que o uso de MEPS na etapa de preparo de amostra permitiu o desenvolvimento de um método prático e rápido, em que necessitam-se de apenas 20 µL de amostra⁴¹.

Figura 4 – Procedimento ilustrativo de preparo de amostra utilizando a técnica MEPS evidenciando as etapas e suas ações [Abdel-Rehim, 2004]⁵.



Recentemente, um método utilizando MEPS (sorvente C_8) na etapa de extração foi descrito por Vickova *et al.* (2011) para a quantificação de atorvastatina e seus metabólitos em amostras de soro humano. No mesmo trabalho foi desenvolvido um método utilizando SPE (sorvente C_{18}) para o preparo da amostra. Comparativamente, foram necessários apenas 50 μL de amostra para análise por MEPS, enquanto que por SPE o volume foi cerca de 20 vezes maior. Conforme relato dos autores, a técnica MEPS mostrou-se mais rápida do que a SPE, necessitando somente 7 min para extração dos analitos a partir de soro humano. Outra vantagem mencionada em relação à técnica SPE foi a possibilidade de reutilização do cartucho MEPS, uma vez que em SPE essa reutilização não é recomendada pelo fabricante. Relatou-se neste estudo que o cartucho MEPS foi reutilizado por 30 vezes sem perda de eficiência de extração e sem que fosse observado efeito residual. Entretanto, Vickova *et al.* (2011) apontaram algumas desvantagens do MEPS, todas elas relacionadas a sua utilização *offline*. Segundo eles, as desvantagens da técnica MEPS *offline* são necessidade de uso de *inserts* (disponíveis comercialmente em volumes relativamente altos, maior ou igual a 100 μL), menor precisão na medida dos volumes e na velocidade dos ciclos de aspiração/ejeção, de modo que a qualificação do analista é essencial para permitir a repetibilidade dos resultados de recuperação dos analitos. Como solução para esses

problemas de precisão, os autores sugerem o uso de volumes superiores a 50 μL . Ainda na comparação das técnicas, os autores apontam que existe uma menor gama de sorventes disponíveis comercialmente para o MEPS do que para SPE tradicional⁴².

Em 2012, Rani *et al.* desenvolveram e validaram um método para detecção de fármacos antiepiléticos em plasma humano e urina usando MEPS C_{18} e cromatógrafo a líquido acoplado a detector ultravioleta (LC-UV do inglês *liquid chromatography with ultraviolet detection*). Neste método foi necessário apenas 1 mL de amostra, enquanto o uso de SPE demandou cerca de 10 mL. O tempo de extração também atendeu às expectativas, e ocorreu em 1,5 min obtendo-se boa recuperação dos analitos (88,5% a 99,3%). Rani *et al.* observaram que apenas 35 μL de eluente eram suficientes para obter recuperação adequada e que o aumento desse volume para 50 μL , além de não aumentar a recuperação, abaixava a sensibilidade do método. Os autores ainda avaliaram o solvente de lavagem e o número de ciclos de aspiração/ejeção da amostra. Observou-se que o uso da mistura água e metanol na etapa de lavagem do sorvente diminuía a recuperação dos fármacos e que 50 μL de água eram suficientes para obtenção dos extratos limpos. Com relação ao número de ciclos na extração, afirmaram que a recuperação é tanto maior quanto maior for o número de ciclos e fixaram o número de 10 ciclos³³.

Em 2004, Abdel-Rehim *et al.* desenvolveram um método para determinação de olomoucina em plasma humano usando apenas 1 mg de polímero de poliestireno como sorvente. Somente 50 μL de plasma fortificado e cerca de 35 μL de metanol foram gastos em todo o procedimento de extração. A seringa MEPS foi conectada a um amostrador, o que possibilitou o ajuste da velocidade dos ciclos de aspiração/ejeção da amostra. Segundo estes autores, os ciclos devem ocorrer de forma lenta para permitir adequada eluição da amostra, e, portanto, optaram por 20 $\mu\text{L s}^{-1}$. Após a extração, a amostra foi injetada diretamente em LC-MS/MS. Além disso, na validação do método desenvolvido por Abdel-Rehim *et al.* (2004) não se observou interferente algum na região de interesse⁴³.

Em outro trabalho publicado em 2006, Abdel-Rehim e Dahlgren usaram metilcianopropil e silarilano (50:50) dissolvido em diclorometano na concentração de

1,5 mg mL⁻¹ no preparo do revestimento polimérico da sílica do cartucho do MEPS. O resultado final foi um sorvente constituído de sílica revestida com polímero de metilcianopropil e silarilano. O MEPS foi então utilizado na extração de ropivacaína em plasma humano, sendo necessários apenas 10 µL de amostra e 10 µL de água na lavagem do sorvente para retirada de interferentes. Na etapa de dessorção foram utilizados 20 µL de mistura de acetonitrila e água (50:50) ou 10 µL de acetonitrila. No primeiro caso, os analitos foram quantificados por LC-MS/MS, e no segundo a separação/detecção dos analitos ocorreu por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas⁴⁴.

Outro formato de MEPS, que incorpora uma válvula no corpo da seringa permitindo que a direção do fluxo do líquido seja manipulada, foi recentemente divulgado³². Nesse estudo a incorporação de duas válvulas permitiu um fluxo independente de eluente e amostra. Como resultado, menor efeito residual da codeína foi observado quando comparado com o MEPS convencional. Desta forma, não foram necessários muitos ciclos de aspiração/ejeção na etapa de lavagem do cartucho antes de sua reutilização, e assim, o consumo de solventes e, principalmente, o tempo para o preparo da amostra foram menores. Durante a análise de cada amostra, apenas cerca de 5 min foram gastos na etapa de extração. Ademais, o novo formato MEPS aumentou a sensibilidade do método, uma vez que os analitos foram suficientemente dessorvidos em baixo volume de eluente. Segundo Candish e colaboradores, com este novo dispositivo a necessidade de otimização do volume do eluente foi eliminada³².

Diversos outros trabalhos empregando MEPS na etapa de preparo de amostras biológicas (urina, saliva, plasma humanos) têm sido descritos na literatura (**Tabela 2**). Conforme pode-se observar a fase reversa tem sido amplamente empregada em MEPS e em análises de fármacos em plasma humano. Além disso, a técnica MEPS possibilita baixo consumo de amostra, adequada recuperação dos analitos e baixos limites inferiores de quantificação (LIQ).

Tabela 2 – Métodos para quantificação de analitos em amostras biológicas preparadas pela técnica MEPS.

Analitos	Sorvente (mg)	Amostra, Volume (μL)	Resultados		Referência
			Recuperação (%)	LIQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Clorpromazina (CPZ), haloperidol (HAL), ciamemazina (CYA), quetiapina (QTP), clozapina (CLOZ), olanzapina (OLZ), levomepromazina (LVMP)	80% C ₈ e 20% SCX 4	Plasma, 250	62,0 – 92,0	0,0008 (OLZ)	Fonseca <i>et al.</i> 2013 ⁴⁵
				0,001 (CPZ e CLOZ)	
				0,004 (LVMP, QTP e CYA)	
				0,006 (HAL)	
Amiodarona (AM), desetilamiodarona (DES)	C ₁₈ 4	Plasma, 100	64,7 – 68,2 (AM) 58,6 – 62,3 (DES)	0,1	Rodrigues <i>et al.</i> 2013 ⁴⁶
Oxcarbamazepina, carbamazepina, fenitoína, alprazolam	C ₁₈ 4	Plasma 1000	89,9 a 99,4	0,0001	Rani <i>et al.</i> 2012 ⁴⁷
Risperidona (RISP), 9-hidroxisperidona (9OHR)	C ₈	Plasma e saliva, 100	>90,0	0,002 (RISP), 0,003 (9OHR)	Mandrioli <i>et al.</i> 2011 ⁴⁸
		Urina, 100		0,004 (RISP), 0,006 (9OHR)	

/continua

Tabela 2 (Continuação e conclusão)

Analitos	Solvente (mg)	Amostra, volume (μL)	Resultados		Referência
			Recuperação (%)	LIQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Metadona (MTD), buprenorfina (BPN), norbuorenorfina (N-BPN), naloxona (NLX)	C ₈ 4	Plasma, 100	>85,0	0,00025 (BPN e N-BPN) 0,003 (MTD) 0,00013 (NLX)	Somainsi <i>et al.</i> 2011 ⁴⁹
Citalopram (CIT), mirtazapina (MIR), paroxetina (PAR), fluoxetina (FLU), sertralina (SER)	C ₈ e SCX 2	Plasma, 400	-	0,025 (MIR) 0,010 (CIT e SER) 0,020 (PAR e FLU)	Chaves <i>et al.</i> 2010 ⁵⁰
Oxcarbazepina (OX) e seus metabólitos (MET)	C ₁₈ 4	Plasma, 50	>86,5	0,050 (OX) 0,125 (MET)	Saracino <i>et al.</i> 2010 ⁵¹
Lidocaína (LID), mepivacaína (MEP), bupivacaína (BUP)	C ₁₈ 4	Plasma, 200	42,4 - 49,6 (LID livre) 78,4 - 80,2 (MEP livre) 20,0 - 24,5 (BUP livre)	0,01 (fármacos livres) 0,001 (total)	Morales- Cid <i>et al.</i> 2009 ⁵²
Ciclosfosfamida	- C ₂	Plasma, 250 Plasma, 50	- -	5 (LC-UV) 0,5 (LC-MS/MS)	Said <i>et al.</i> 2008 ⁵³

2.2.3 Determinação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano

Na literatura, há relatos de vários métodos para a quantificação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano (**Tabela 3**), todos empregando técnicas convencionais de preparo de amostras (PP, LLE e SPE) e detecção principalmente por LC-UV.

Como exemplos de solventes para extração em LLE, citam-se diclorometano^{17,54,55}, mistura de diclorometano e álcool isoamílico⁵⁶, dietil éter⁵⁷ e mistura de dietil éter e hexano (80:20)⁵⁸. A acetonitrila tem sido o solvente mais utilizado como agente precipitante na extração por PP^{59,60,61,62,63}. Em poucos estudos relatou-se o emprego de SPE para o preparo de amostra de plasma humano contendo os antidiabéticos orais CL, GZ e GM. Entretanto, Lakshmi *et al.* (2011) e Kundlik *et al.* (2012), utilizaram cartuchos SPE Oasis HLB empacotados com sorventes de fase reversa^{64,65}.

Tabela 3 - Métodos para quantificação de fármacos antidiabéticos orais (clorpropamida, CL; gliclazida, GZ, e glimepirida, GM) em plasma humano preparado por diferentes técnicas.

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
CL	PP	2000 – 40000	1	LC-UV	-	2	Danlami <i>et al.</i> 2011 ⁶⁶
CL	LLE	0 – 40000	0,5	LC-UV	-	-	Bakare <i>et al.</i> 2008 ⁵⁴
CL	LLE	1000 – 50000	0,5	LC-UV	98,9	1	Odunola <i>et al.</i> 2007 ¹⁸
CL	LLE	0 – 50000	1	LC-UV	99,2	5	Chua <i>et al.</i> 1998 ⁵⁵
CL	LLE	1000 – 50000	0,5	LC-UV	95,8	1	Bakare <i>et al.</i> 1994 ¹⁷
GZ	PP microLLE	200 – 10000	0,010	Capilar LC-MS/MS MALDI- TOF MS	100,0	0,2	Feng <i>et al.</i> 2009 ⁶⁷

/continua

Tabela 3 (Continuação)

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
Benazepril (BEN), GZ e valsartan (VAL)	PP	10 – 2000 (BEN e GZ) 100 – 20000 (VAL)	0,1	LC-MS/MS	> 90,0	0,002 (BEN e GZ) 0,020 (VAL)	Hu <i>et al.</i> 2009 ⁶⁸
GZ	LLE	20 – 10000	0,2	LC-MS/MS	> 84,0	0,020	Mendes <i>et al.</i> 2007 ⁵⁸
GZ	PP	10 – 5000	0,45	LC-UV	94,9	0,010	Foroutan <i>et al.</i> 2006 ⁶⁰
GZ	LLE	2,5 – 2000	0,2	LC-MS/MS	97,9	0,0025	Ling <i>et al.</i> 2006 ⁶⁹
GB, GZ, GLP, PIO, repaglinida (REP) e rosiglitazona (ROS)	LLE	100 – 100000 (300 – 100000 para GB)	-	LC-UV	99,4	0,1 (0,3 para GB)	Venkatesh <i>et al.</i> 2006 ⁷⁰

Tabela 3 (Continuação)

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
MEF e GZ	PP	7,8 – 4678,9 (MEF) 10 – 10000 (GZ)	0,2	LC-MS/MS	71,0 a 83,6 (MEF) 88,1 a 104,0 (GZ)	0,0078 (MEF) 0,010 (GZ)	Zhong <i>et al.</i> 2005 ⁷¹
GZ	PP	0,05 – 4,00 µM	0,1	LC-ED	> 99,1	50 nM	Kuo <i>et al.</i> 2005 ⁶¹
GZ	PP	100 – 10000	0,5	LC-UV	> 80,0	0,1	Park <i>et al.</i> 2004 ⁷²
GZ	PP	-	0,5	LC-UV	92,5	0,20	Najib <i>et al.</i> 2002 ⁷³
GZ	LLE	100 – 12800	0,25	LC-UV	-	0,1	Poirier <i>et al.</i> 1987 ⁷⁴
ROS e GM	PP	100 – 250 (ROS) 125 – 12500 (GM)	1	LC-UV	97,70 (ROS) 98,10 (GM)	0,1 (ROS) 0,125 (GM)	El-Enany <i>et al.</i> 2012 ⁶²

Tabela 3 (Continuação)

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
GM	SPE	2,0 – 650,0	0,2	LC-MS/MS	81,9	0,002	Kundlik <i>et al.</i> 2012 ⁶⁵
ROS, PIO, GLP, GZ, REP, nateglinida (NGL), GB e GM	SPE	50 - 2000	-	LC-UV	75,5 a 84,5	0,024 (ROS) 0,036 (PIO) 0,035 (GLP) 0,030 (GZ) 0,020 (REP) 0,020 (NGL) 0,040 (GB) 0,038 (GM)	Lakshmi, K.S. e Rajesh, T. 2011 ⁷⁵
GLP, ROS, PIO, GB e GM	PP	100 – 100000	1	LC-UV	90,0	0,1	Lakshmi, K.S. e Rajesh, T. 2011 ⁶⁴
GM	PP	0,2 – 200	0,1	LC-MS/MS	84,7	0,0002	Noh <i>et al.</i> 2011 ⁵⁹

Tabela 3 (Continuação)

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
MEF, GM e PIO	LLE	10 – 1500 (MEF)	0,5	LC-MS/MS	93,0	0,010 (MEF)	Sengupta <i>et al.</i> 2009 ⁵⁶
		2,5 – 500 (GM)				0,0025 (GM)	
		2,5 – 1000 (PIO)				0,0025 (PIO)	
GM	LLE	0,02 – 100,00	0,2	LC-MS/MS	87,3	0,00002	Chakradhar <i>et al.</i> 2008 ⁷⁶
GM	LLE	5 – 1000	0,5	LC-MS/MS	88,7	0,005	Yuezueak <i>et al.</i> 2007 ⁷⁷
GM	LLE	0,50 – 1000	1	LC-MS/MS	95,6	0,0005	Pistos <i>et al.</i> 2005 ²¹

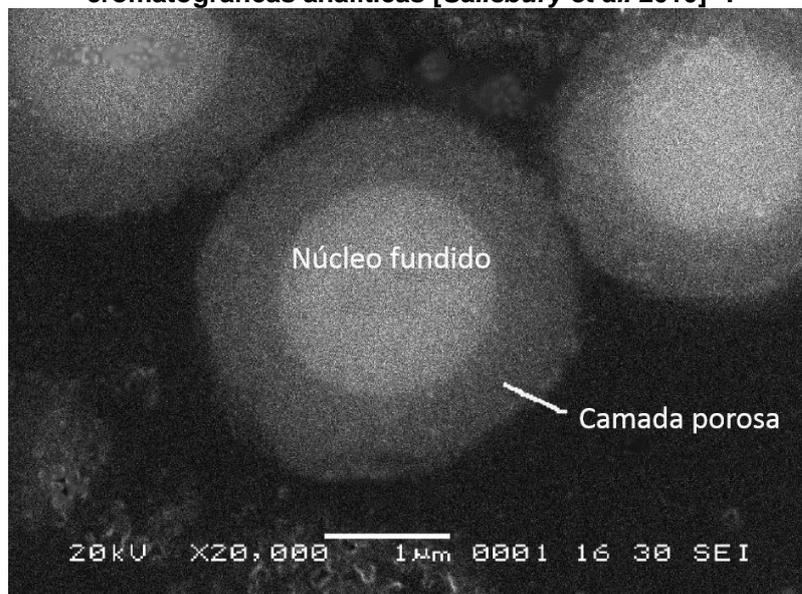
Tabela 3 (Conclusão)

Analitos	Técnica de preparo de amostra	Faixa (ng mL ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Método analítico	Resultados		Referência
					Recuperação (%)	LIQ (µg mL ⁻¹)	
GM	LLE	2,0 – 500,0	0,35	LC-MS/MS	18,8 (concentração baixa) 24,4 (média) 22,7 (alta)	0,002	Dotsikas <i>et al.</i> 2005 ⁷⁸
GM	PP	10 – 400	0,9	LC-UV	-	0,010	Song <i>et al.</i> 2004 ⁶³
GM	LLE	5,0 – 500,0	1	LC-MS/MS	86,4 a 92,0	0,0005	Salem <i>et al.</i> 2004 ⁵⁷
GM	LLE	0,1 – 200	1	LC-MS/MS	71,2 a 79,8	0,0001	Kim <i>et al.</i> 2004 ⁷⁹
GM	LLE	0,1 – 500	1	LC-MS/MS	75,5	0,0001	Kim <i>et al.</i> 2004 ⁸⁰
	SPE	0,5 – 500	1		85,5	0,0005	
	PP	1,0 – 500	0,2		98,1	0,001	

2.3 Colunas cromatográficas empacotadas com partículas de núcleo fundido

Recentemente, foram introduzidas no mercado colunas cromatográficas contendo partículas de núcleo fundido. Essas partículas possuem a parte externa porosa de 0,5 μm e um núcleo sólido de 1,7 μm , constituído por sílica fundida (**Figura 5**)⁸¹. Uma das grandes vantagens do uso dessas partículas é o menor caminho de difusão quando comparadas com partículas inteiramente porosas (colunas convencionais). Esse reduzido caminho intra-partícula favorece a transferência de massa, aumentando a eficiência de separação e reduzindo o alargamento de bandas. Além disso, proporcionam menor pressão no sistema cromatográfico do que as partículas menores que 2 μm (sub-2 μm), podendo ser empregadas em sistemas de HPLC convencionais e sob altas vazões da fase móvel. Dessa maneira, separações rápidas são possíveis em um sistema de HPLC convencional com alta eficiência e resolução. Outra característica é a distribuição homogênea das partículas de mesmo tamanho no leito cromatográfico, o que leva a um robusto empacotamento das partículas. Ademais, as colunas de núcleo fundido são menos suscetíveis a problemas de obstrução do frit (porosidade do frit de 2 μm), muito frequentes em colunas sub-2 μm (porosidade do frit de 0,5 μm), principalmente em análises de amostras de matrizes complexas^{81,82}.

Figura 5 – Micrografia de partículas de núcleo fundido de 2,7 μm utilizadas como fase estacionária de colunas cromatográficas analíticas [Salisbury et al. 2010]⁸².



Em uma abordagem da química verde, um estudo recente foi publicado por Abdel-Rehim *et al.* (2013) empregando microcolunas no desenvolvimento de método bioanalítico, a técnica MEPS no preparo de amostra, LC-MS/MS na etapa de separação cromatográfica e o analito AZD6319 (um novo pró-fármaco para o tratamento da doença de Alzheimer). As microcolunas testadas foram BEH (C₁₈; 0,3 x 50 mm; 1,7 µm; Waters, Manchester, USA), Halo (C₁₈; 0,3 x 50 mm; 1,7 µm; Advanced Material Technologies, Wilmington, USA), BEH (C₁₈; 1,0 x 50 mm; 1,7 µm; Waters, Manchester, USA), ACE (C₁₈; 1,0 x 50 mm; 3,0 µm; Advanced Material Technologies, Wilmington, USA) e ZirChrom-PBD (1,0 x 50 mm, 3,0 µm; ZirChrom Separations, Anoka, USA). Segundo os autores, todas apresentaram exatidão e precisão satisfatórias, e eficiência cromatográfica sob baixa pressão do sistema foi obtida com a utilização de coluna de partículas de núcleo fundido HALO. Abdel-Rehim *et al.* (2013) concluíram que o uso de microcolunas em bioanálises é vantajoso por aumentar a sensibilidade do método quando comparado com colunas convencionais, como também por reduzir o tempo da corrida cromatográfica, e consequentemente o consumo de solventes e o custo por análise⁸³.

Objetivando obter um método rápido, Magiera *et al.* (2013) utilizaram MEPS na etapa de preparo de amostra, coluna de núcleo fundido (Agilent, PoroShell 120 EC-C₁₈; 100x3,0 mm; 2,7 µm) na etapa de separação e realizaram a detecção por HPLC-UV. Os autores concluíram que o emprego das técnicas MEPS/HPLC-UV com colunas de núcleo fundido possibilitaram o desenvolvimento de método rápido e prático⁴¹.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método para determinação de fármacos antidiabéticos orais em amostras de plasma humano utilizando a técnica MEPS na etapa de preparo de amostra, a técnica HPLC com coluna contendo partículas de núcleo fundido na separação e detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta na etapa de quantificação.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar método de identificação e quantificação dos fármacos clorpropamida, glibenclamida (padrão interno), gliclazida e glimepirida utilizando cromatografia líquida de alta eficiência por meio de coluna contendo partículas de núcleo fundido e detecção por espectrofotometria no ultravioleta (HPLC-UV).
- Desenvolver e otimizar método de preparo de amostra por MEPS para determinação de clorpropamida, glibenclamida (padrão interno), gliclazida e glimepirida em plasma, empregando planejamento experimental.
- Validar o método desenvolvido empregando a técnica MEPS de acordo com a RDC 27/2012 ANVISA.
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de plasma humano provenientes de voluntários nos quais os fármacos foram administrados, conforme resolução CNS 196/1996 CONEP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 *Substâncias químicas de referência (SQR), matérias-primas e medicamentos*

- Clorpropamida SQR (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde /INCQS – Brasil), lote 1019.
- Glibenclamida SQR (INCQS – Brasil), lote 1018.
- Gliclazida SQR (INCQS – Brasil), lote 1057.
- Glimepirida SQR (United States Pharmacopeia (USP) – EUA), lote G0K135.
- Clorpropamida matéria-prima adquirida na Farmácia Artesanal (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada por Kothari Phytochemicals International (Nagari, Índia), lote CP 1007, pureza 100,12%.
- Glibenclamida matéria-prima doada pela Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Cadila Pharmaceuticals (Ahmedabad, Gujarat, Índia), lote 0GLL009, pureza 99,50%.
- Gliclazida matéria-prima doada pela CIFARMA (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Shandong Keyuas Pharmaceutical (Jinan, Shandong, China), lote 0809130, pureza 99,10%.
- Glimepirida matéria-prima doada pela CIFARMA (Belo Horizonte, Brasil) e fabricada pela Mantena Laboratories (Nalgonda Dist, Andhra Pradesh, Índia), lote GD/021/11/2011, pureza 99,96%.
- Diabinese® comprimidos – 250 mg (Laboratório Pfizer Ltda. – São Paulo, Brasil).
- Diamicron® MR comprimidos de liberação modificada – 30 mg (Laboratório Servier do Brasil Ltda – Rio de Janeiro, Brasil).
- Glimepirida comprimidos (medicamento genérico) – 4 mg (Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda – Cambé, Brasil).

4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Acetonitrila e metanol grau HPLC e citrato de sódio dihidratado (J. T. Baker – Xalostoc, México).
- Ácido cítrico monohidratado P.A. e carbonato de sódio anidro P.A. (Labsynth – Diadema, Brasil).
- Ácido fosfórico 85% e hidróxido de sódio P.A. (Merck – Darmstadt, Alemanha).
- Bicarbonato de sódio P.A. Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).
- Fosfato de potássio monobásico (Sigma Aldrich – Steinheim, Alemanha).
- Membranas filtrantes hidrofílicas de acetato e nitrato de celulose 0,45 µm 47 mm.
- Água ultrapura (purificada em sistema Direct-Q 3 Millipore).
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Tubos Falcon de 15 mL e de 50 mL.
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL e de 2,0 mL.
- Vidraria comum de laboratório, como béqueres e kits de filtração.
- Agulha à vácuo para coleta de sangue (25x0.8mm(21G), suporte para agulha (canhão), garrote, algodão, escalpe e álcool 70% para coleta de sangue.
- Tubo de 9 mL para coleta de sangue à vácuo contendo anticoagulante heparina sódica.

4.1.3 Amostras biológicas

Amostras de sangue de voluntários sadios foram coletadas no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. O sangue dos indivíduos foi utilizado no preparo da fração de plasma desprovido de medicamentos (plasma branco). Amostras de sangue de três voluntários que fizeram uso dos fármacos antidiabéticos orais foram obtidas 2, 6 e 3 h após administração de 250 mg de CL, 90 mg de GZ e 4 mg de GM, respectivamente. O tempo de coleta foi escolhido conforme t_{max} apresentado no item 2.1.1.1. Estas amostras também foram coletadas no Laboratório de Hematologia Clínica. Cada voluntário fez uso de apenas um dos medicamentos.

As coletas foram realizadas utilizando tubos contendo heparina sódica. Após coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 480xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante (plasma) foi devidamente separado e armazenado a temperatura de -70 °C até o momento de seu uso.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da UFMG, protocolo CAAE 01892012.0.0000.5149.

4.1.4 Equipamentos e materiais

- Agitador de tubos Vortex Phoenix Lufesco modelo AP56 (Araraquara, Brasil).
- Aparelho de ultrassom Maxclean modelo 1400 (São Bernardo do Campo, Brasil).
- Balança micro-analítica BP 210D Sartorius com precisão de 0,01 mg (Goettingen, Alemanha).
- Cartuchos MEPS C₁₈ contendo 4 mg de sorvente, tamanho de partícula 45 µm, tamanho do poro 60 Å, P/N 2900501, lote K06-A0495, SGE Analytical Science (Victoria, Austrália).
- Centrífuga Jouan modelo MR 23 I (Saint-Herblain, França).
- Coluna cromatográfica Kinetex C₁₈ (100 x 4,6 mm; 2,6 µm; Phenomenex Torrance, USA), gentilmente doados pela Allcrom (São Paulo, Brasil).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent HP-1200, com forno, injetor automático e detector ultravioleta-visível de arranjo de diodos (UVVis/DAD) Agilent (Santa Clara, USA).
- Estufa a vácuo Fanem 091 (São Paulo, Brasil).
- Estufa a seco B180 Nabertherm (Lilienthal, Alemanha).
- Freezer 220 V REVCO modelo UTL-2186-5-D34 (Garden Grove, USA).
- Kit de desenvolvimento MEPS lote K06-A0498, SGE Analytical Science (Victoria, Austrália).
- KrudKatcher Ultra HPLC filtro em linha com profundidade de 0,5 µm e diâmetro interno de 0,004 in, código 120879901, referência AF0-8497 (Phenomenex, Torrance, USA), gentilmente doado pela Allcrom (São Paulo, Brasil).
- Seringa 250 µL lote K12-C0009, SGE Analytical Science (Victoria, Austrália).

- Sistema de purificação de água Direct-Q 3 Millipore (Billerica, USA).
- Micropipeta Brand 100 – 10 μL Transferpette® 07X4002 (Essex, USA).
- Micropipeta Thermo Scientific 1000 – 100 μL FinnpiPETTE® F3 DJ02027 CE (Waltham, USA).
- Potenciômetro Metrohm 827 pH LAB e eletrodo Metrohm 6.0228.010 pH 0 – 14, 0 – 80 °C NTC, 3M KCL (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador comercial de grande porte 894 L Gelopar modelo GRCS-4PV (Araucária, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo de soluções

Soluções estoque de CL, GZ, GM e GB na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ foram individualmente preparadas pela dissolução de 12,5 mg de cada fármaco em acetonitrila e água 4:1 (v/v). Em seguida, 1 mL de cada solução estoque foi diluída em acetonitrila e água 1:1 (v/v) para obter uma solução trabalho na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que por sua vez foi usada para fortificar o plasma humano na concentração de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções estoque foram armazenadas a 4 °C por 1 mês.

Durante a validação do método, soluções estoque de CL, GZ, GM e GB na concentração de 5 mg mL⁻¹, 3,2 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹ e 1,25 mg mL⁻¹ respectivamente, foram preparadas dissolvendo-se quantidades apropriadas do padrão SQR de cada fármaco em acetonitrila e água 4:1 (v/v). Volumes apropriados de solução estoque foram individualmente diluídos em acetonitrila e água 1:1 (v/v) para obter soluções intermediárias: 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CL, 320 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GZ e 41,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GM. Soluções estoque e intermediária foram usadas para preparar soluções de trabalho. Soluções estoque e intermediária foram armazenadas por pelo menos 40 dias a 4 °C (exceto solução estoque da CL). A solução trabalho do padrão interno (PI) contendo 225 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GB (obtida pela diluição da solução estoque), bem como a própria solução estoque do PI contendo 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GB, foram estocadas a 4 °C por 33 dias. Soluções de trabalho foram sempre preparadas no

mesmo dia da análise. O prazo de estocagem das soluções foram definidos em teste de estabilidade dos fármacos em solução.

4.2.2 Desenvolvimento do método bioanalítico para determinação de CL, GZ, GM e GB em plasma humano

4.2.2.1 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas

Inicialmente, alguns parâmetros cromatográficos (mistura de acetonitrila e solução de fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 3,0 na proporção 55:45 como fase móvel, 30 °C como temperatura do forno da coluna e comprimento de onda igual a 230 nm) foram definidos⁸⁴. Objetivando obter um método mais eficiente, rápido e moderno, empregaram-se na separação cromatográfica uma coluna contendo partículas de núcleo fundido Kinetex C₁₈ (100 x 4,6 mm; 2,6 µm) e o cromatógrafo a líquido Agilent HP1200.

Configurações do equipamento que poderiam comprometer a eficiência proporcionada pela coluna de núcleo fundido, foram otimizadas. Foram avaliados por meio de testes uni-variados: como as dimensões (diâmetro e comprimento) da tubulação (volume extracoluna de aproximadamente 43,98 e 26,06 µL), o volume de injeção (5, 10 e 20 µL), as diferentes vazões (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 mL min⁻¹), a frequência de aquisição dos dados e o tempo de resposta do detector (20 Hz/0,1 s, 10 Hz/0,5 s, 2,5 Hz/2 s e 0,62 Hz/8 s). Essas avaliações foram realizadas pela injeção de solução de uracila a 5 µg mL⁻¹ em comprimento de onda igual a 254 nm.

Em seguida, otimizou-se a separação dos fármacos antidiabéticos orais CL, GZ, GM e GB preparados em soluções padrão na concentração de 5 µg mL⁻¹. Diferentes proporções da mistura de acetonitrila e fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 3,0 (50:50; 55:45 e 60:40) e vazões da fase móvel foram testados, mantendo-se fixo o comprimento de onda de detecção em 230 nm. Ajustes na frequência de aquisição dos dados / tempo de resposta do detector também foram realizados objetivando reduzir o ruído da linha de base. Alterações na proporção e vazão da fase móvel, bem como no tamanho da tubulação, foram necessárias para reduzir a pressão do

sistema. Os ajustes foram realizados durante o desenvolvimento do método analítico. Assim como o volume de injeção da amostra também foi avaliado anteriormente a validação com o intuito de aumentar a sensibilidade do método.

As condições cromatográficas do método desenvolvido e validado constam na **Tabela 4**. A eluição foi isocrática.

Tabela 4 - Condições cromatográficas do método desenvolvido e validado para determinação de clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) utilizando glibenclamida (GB) como PI.

Parâmetro	Condição
Coluna	Kinetex C ₁₈ (100 x 4,6 mm; 2,6 µm)
Fase móvel	Acetonitrila: solução fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 3,0 (60:40)
Vazão	1,2 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	230 nm
Volume de injeção	20 µL
Frequência de aquisição dos dados/ tempo de resposta do detector	10 Hz/0,5 s

4.2.2.2 Otimização das condições para o preparo de amostra por meio de MEPS

Inicialmente, soluções de CL, GZ, GM, GB a 4 µg mL⁻¹ em água (em substituição ao plasma humano) foram utilizadas como amostra para avaliar a extração dos analitos pelo sorvente C₁₈, bem como avaliar as etapas de limpeza do cartucho MEPS. No estudo da etapa de lavagem, também foram empregadas amostras de plasma humano contendo CL, GZ, GM e GB, a 4 µg mL⁻¹. Avaliou-se o uso de 4 ciclos de 100 µL de água ultrapura na etapa de lavagem entre a extração e dessorção pelo MEPS. Similarmente, 4 ciclos de 100 µL de acetonitrila seguido de 4 ciclos de água ultrapura foram testados na etapa de lavagem após dessorção dos analitos e antes da reutilização do cartucho MEPS. O volume de cada ciclo foi fixado conforme conveniência na utilização da seringa MEPS, respeitando o recomendado pelo fabricante. As soluções utilizadas nas etapas de lavagem e a amostra de água (que

inicialmente continha CL, GZ, GM e GB a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram injetadas no sistema cromatográfico. Além disso, as extrações em plasma foram executadas em dias diferentes.

Na otimização dos demais parâmetros foram utilizadas ferramentas da quimiometria. As etapas de extração e de dessorção foram estudadas separadamente, uma vez que essas etapas são independentes. Na construção dos planejamentos experimentais foram estudados os parâmetros considerados inicialmente os mais importantes para cada etapa. Essa seleção objetivou reduzir o número de experimentos necessários em cada planejamento. Os níveis, por sua vez, foram definidos de acordo com a literatura³⁸.

Na etapa de extração foi empregado um planejamento fatorial fracionário (PFF) meia fração com dois níveis e quatro variáveis (PFF 2^{4-1}) e ponto central. Na **Tabela 5**, são apresentados os níveis para cada variável estudada. Usualmente volumes entre 10 – 250 μL de amostra são utilizados no preparo de amostra com MEPS³⁸. Entretanto, devido às baixas concentrações plasmáticas dos fármacos antidiabéticos orais, se fez necessário escolher níveis relativamente maiores para o parâmetro volume da amostra (x_1). A diluição da amostra (x_2) e o número de ciclos de aspirações e ejeções (x_3), por sua vez, usualmente são reduzidos³⁸. Por isso, foram escolhidos níveis que levassem a uma menor diluição da amostra e possibilitassem trabalhar com poucos ciclos de aspiração/ejeção. Os níveis do pH da solução tampão (x_4) foram definidos conforme testes iniciais envolvendo o plasma humano contendo os fármacos e o tampão (descritos detalhadamente em resultados) nos quais observou-se turvação do plasma quando alguns valores de pH do tampão foram empregados. O volume de amostra aspirado pela seringa em cada ciclo foi fixado em 100 μL e acetonitrila foi o solvente escolhido para a eluição dos analitos.

No total foram executados 11 experimentos para avaliar a etapa de extração. Oito deles correspondem ao planejamento fatorial em si, e três ao ponto central, conforme apresentado na **Tabela 6**. Na elaboração da matriz do planejamento, a variável x_4 foi obtida pelo produto das variáveis x_1 , x_2 e x_3 . Os experimentos foram realizados aleatoriamente, conforme definido no Software Statistica 7.0.

Tabela 5 - Variáveis e seus respectivos níveis do PFF 2⁴⁻¹ para otimização da etapa de extração por MEPS.

Variável (x _i)	Níveis		
	-1	0	+1
Volume da amostra (μL) (x ₁)	100	250	400
Diluição da amostra (x ₂)	1:1	1:2	1:3
pH da solução tampão (x ₃)	2,5*	6,0**	9,5***
Número de ciclos de aspirações e ejeções (x ₄)	5	10	15

Em que: -1 = nível inferior, 0 = ponto central, +1 = nível superior. * Tampão citrato pH 2,5. ** Tampão citrato pH 6,0. ***Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,5.

Tabela 6 - Experimentos do PFF 2⁴⁻¹ para otimização da etapa de dessorção por MEPS.

Número do experimento	Nível de cada variável			
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

x₁ a x₄ representam as variáveis da etapa de extração, em que x₁ = volume da amostra, x₂ = diluição da amostra, x₃ = pH da solução tampão, x₄ = número de ciclos de aspirações e ejeções. -1 = nível inferior da variável, 0 = ponto central, +1 = nível superior da variável.

Para avaliar os parâmetros que afetam a dessorção, foi usado planejamento fatorial completo com 2 níveis e 2 variáveis (PFC 2²). As variáveis e níveis avaliados estão descritos na **Tabela 7**. As proporções de 50% e 100% de acetronitrila foram estudadas na etapa de dessorção dos analitos pelo MEPS, pois os fármacos antidiabéticos orais mostraram em testes iniciais serem muito solúveis nesse solvente. No caso do parâmetro número de ciclos de aspiração e ejeção, a escolha dos níveis se deu pela necessidade de pelo menos 100 μL de amostra após

dessorção dentro do insert para permitir sua injeção no sistema cromatográfico. Portanto, o nível mais baixo foi fixado em 2. O nível mais alto foi 4 para possibilitar uma melhor avaliação desse parâmetro. Os 4 experimentos desse planejamento (**Tabela 8**) foram realizados em duplicata e de forma aleatória. O volume de eluente aspirado pela seringa em cada ciclo foi fixado em 50 μL de acordo com a literatura³⁸.

Tabela 7 - Variáveis e seus respectivos níveis do PFC 2² para otimização da etapa de dessorção por MEPS.

Variáveis (y_i)	Níveis	
	-1	+1
Proporção acetonitrila (y_1)	50%	100%
Número de ciclos de aspiração e ejeção (y_2)	2	4

Tabela 8 - Experimentos do PFC 2² para otimização da etapa de dessorção por MEPS.

Experimento	Nível de cada variável	
	y_1	y_2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

y_1 e y_2 representam as variáveis da etapa de dessorção, em que y_1 = proporção de acetonitrila, y_2 = número de ciclos de aspiração e ejeção. -1 = nível inferior da variável, +1 = nível superior da variável.

Todos os experimentos dos planejamentos experimentais foram executados utilizando MEPS nas seguintes condições seringa de 250 μL e 4 mg de material sorvente C_{18} . Antes de ser usado pela primeira vez, o sorvente foi condicionado com 250 μL de metanol seguido de 250 μL de água. O plasma foi fortificado com os fármacos para obter concentração de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, posteriormente foi diluído com tampão. Em seguida, 100 μL dessa mistura foram aspirados e ejetados manualmente empregando MEPS, sendo a amostra descartada no frasco original. Na sequência, o sorvente foi lavado 4 vezes com 100 μL de água para a remoção de interferentes. Por fim, os analitos foram dessorvidos com ciclos de 50 μL do eluente. Antes de ser reutilizado, o cartucho contendo o sorvente foi lavado e reconicionado 4 vezes com 100 μL de acetonitrila, seguido de 4 vezes com 100 μL de água.

Na etapa de análise dos resultados obtidos pelos planejamentos experimentais foi utilizado o software Statistica 7.0 (StatSoft, Victoria, Austrália). A estimativa do erro puro, que é o erro experimental, foi calculada a partir das replicatas do ponto central no caso do PFF 2^{4-1} (n=3) e a partir das replicatas reais no PFC 2^2 (n=2). O ponto central, no primeiro caso, foi adicionado com objetivo de possibilitar o cálculo do erro experimental sem aumentar muito o número de experimentos⁸⁵.

Após o estudo das etapas de extração e dessorção e antes da validação do método bioanalítico, foram executados testes variando o volume de plasma (100 e 400 μ L) com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método de modo a permitir sua aplicação às amostras de plasma humano.

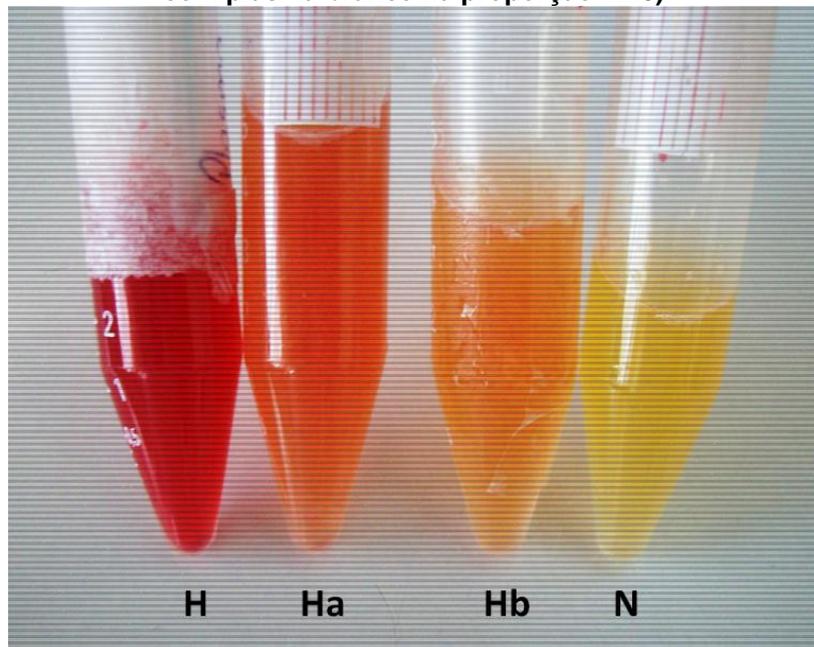
4.2.3 Validação do método bioanalítico

A validação do método bioanalítico foi realizada de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC 27/2012⁸⁶. Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação e limite de detecção. Além disso, foram realizados estudos de estabilidade dos fármacos em líquidos biológicos e nas soluções padrão estoque (maior concentração) e trabalho (menor concentração). Todos os experimentos foram realizados usando plasma fortificado com soluções padrão dos fármacos em concentrações que incluem os níveis terapêuticos normalmente encontrados em pacientes.

Para a avaliação da seletividade foram utilizadas amostras de plasma de 6 origens diferentes. Dessas, cinco amostras de sangue foram coletadas pela manhã de indivíduos em leve jejum (para obtenção das amostras normais e plasma hemolisado) e uma coleta pós-prandial (para obtenção do plasma lipêmico). O leve jejum se caracteriza por uma alimentação pouco calórica e sem alimentos que contenham xantinas (como café preto e chocolates). Quatro amostras seguiram procedimento normal de preparo do plasma sem ser induzido a hemólise (plasma normal). Em uma amostra induziu-se a hemólise das hemácias, através de ciclos de resfriamento e agitação em vórtex. Entretanto essa amostra apresentou coloração

superior ao esperado. Por isso, ela foi diluída utilizando fração de plasma branco. Por fim, obtiveram-se 2 amostras de plasma hemolisado diluídas (**Figura 6**), que foram utilizadas no teste seletividade. Dessa forma, foram analisadas 7 amostras de plasma: 4 normais (sem hemólise e coletado em leve jejum, designadas como Normal 1, Normal 2, Normal 3, Normal 4), 2 hemolisadas (designadas como Hemolisado Ha e Hemolisado Hb) e 1 lipêmica (designada Lipêmico).

Figura 6 - Coloração das amostras de plasma hemolisado (H, Ha e Hb) e fração de plasma branco normal (N) usado no preparo de Ha e Hb, que por sua vez foram utilizadas no teste seletividade (Ha, plasma hemolisado diluído com plasma branco na proporção 1:10; Hb, plasma hemolisado diluído com plasma branco na proporção 1:20).



As 7 amostras distintas de plasma foram fortificadas com os fármacos antidiabéticos orais na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ). Os resultados obtidos foram comparados com as respectivas amostras processadas do plasma branco (isento de analito) de cada uma das 7 matrizes para a avaliação do seletividade do método.

O efeito residual foi avaliado por meio da injeção de uma mesma amostra de plasma branco por três vezes: uma injeção antes e duas injeções após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ).

A linearidade foi avaliada em 3 curvas independentes de calibração preparadas em dias diferentes. As curvas de calibração consistem em uma amostra branca (matriz processada sem PI), uma amostra zero (matriz processada com PI) e 6 níveis de concentração de plasma fortificado com os antidiabéticos orais. As curvas de calibração foram construídas nas seguintes concentrações: 1,0; 2,0; 10,0; 20,0; 35,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GZ and 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GM. Após o plasma ter sido fortificado nessas concentrações de cada fármaco (CL, GZ e GM) e antes da extração pelo MEPS, PI foi adicionado para atingir a concentração de 10,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GB. O limite de quantificação foi definido como a menor concentração mensurável com relação sinal/ruído não inferior a 10. O limite de detecção foi definido como 1/3 do limite de quantificação.

Precisão e exatidão intracorrída e intercorrída foram determinadas pela análise de amostras ($n=5$) contendo quantidade conhecidas dos fármacos em 5 níveis de concentração (LIQ, controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD) em três dias de análise, de acordo com **Tabela 9**. A concentração da amostra CQD foi definida como 1,5 vezes a concentração do LSQ. Antes da extração pelo MEPS, essa amostra foi diluída com plasma branco na proporção 2:1 (v/v) e concentrações iguais ao do LSQ foram obtidas (50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL, 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GZ and 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GM). O estudo da precisão e exatidão da amostra CQD permite avaliar se é possível quantificar o analito após a diluição do plasma humano.

A recuperação dos analitos e do PI foi realizada pela comparação dos resultados obtidos da extração de amostras fortificadas em 3 concentrações (CQB, CQM e CQA) com a matriz extraída pelo MEPS adicionada posteriormente de padrões nos mesmos níveis de concentração que representam 100% de recuperação.

Tabela 9 - Níveis de concentração dos analitos clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) para validação bioanalítica por HPLC-UV.

Nível	Concentração do analito ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	CL	GZ	GM
LIQ	1,00	1,00	0,10
CQB	3,00	3,00	0,30
CQM	21,25	4,89	0,49
CQA	42,50	8,50	0,85
CQD	75,00	15,00	1,50

Em que: CQB corresponde a 3 vezes o valor do LIQ, CQM ao valor médio aproximado entre CQB e CQA, e CQD a 1,5 do valor de LSQ.

A estabilidade dos fármacos CL, GZ e GM em plasma humano foi avaliada em diferentes circunstâncias: estabilidade após três ciclos de 12 h de congelamento a -70 °C e descongelamento a temperatura ambiente, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração, e estabilidade pós-processamento. A estabilidade de curta duração foi avaliada mantendo-se as amostras sobre a bancada a temperatura ambiente por 24 h. Após esse período as amostras foram processadas e na sequência injetadas em cromatógrafo a líquido. Na estabilidade de longa duração, por sua vez, as amostras foram analisadas após 60 dias de congelamento a -70 °C. Por sua vez, no teste da estabilidade pós-processamento, as amostras foram mantidas no injetor por 48 h antes de iniciar a análise cromatográfica. Amostras de CQB e CQA foram analisadas em replicata (n = 3).

Além disso, a estabilidade de CL, GZ, GM e PI nas soluções estoque e trabalho foram avaliadas pela comparação dos resultados entre uma nova solução e soluções armazenadas por 40 dias (33 dias para CL e PI) a 4 °C. Nessa avaliação foram utilizadas solução estoque de maior concentração e solução de trabalho de menor concentração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais e das condições cromatográficas

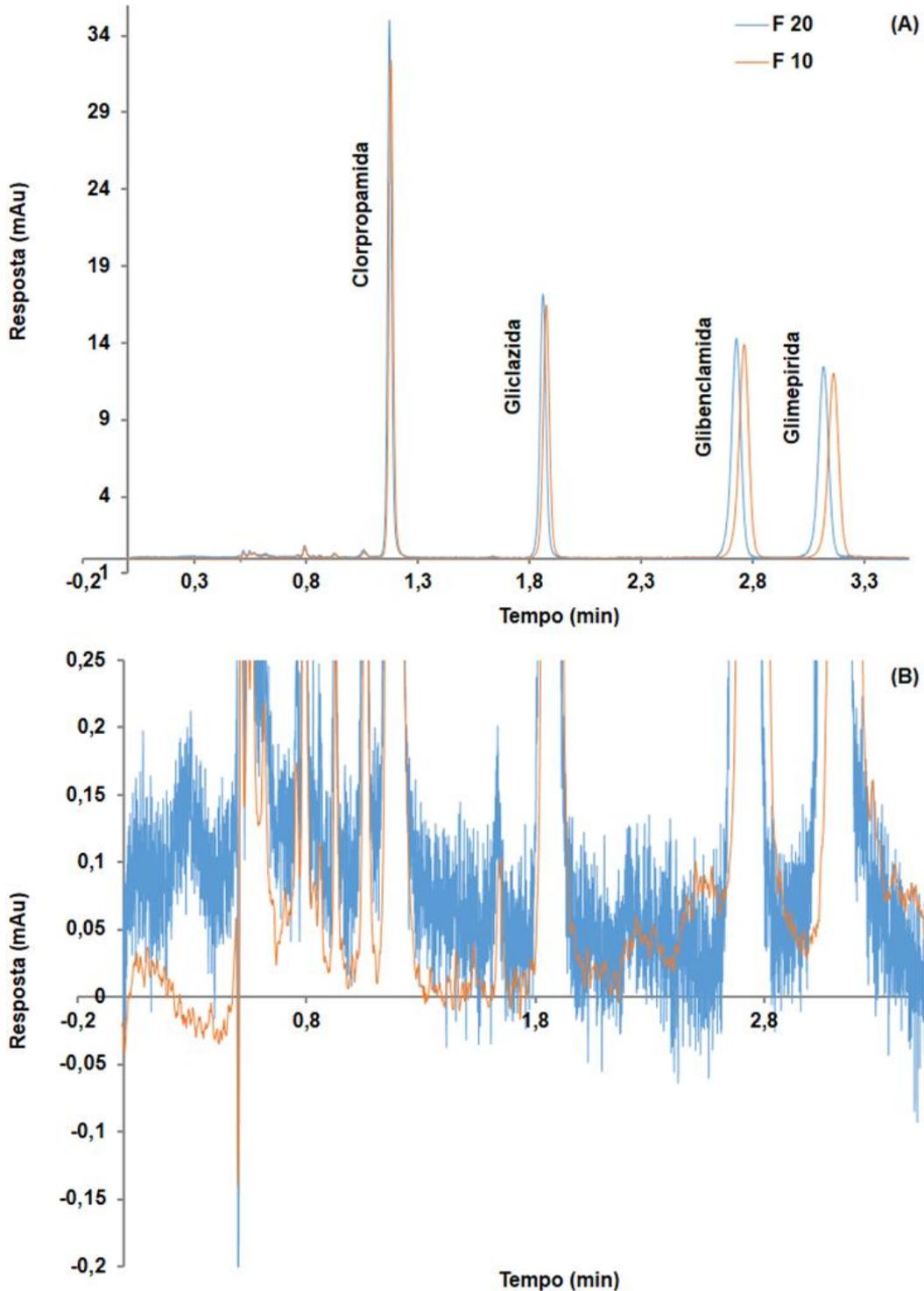
Na otimização dos parâmetros instrumentais, verificou-se que a tubulação com menor diâmetro e comprimento (volume extracoluna de 43,98 μL antes e 26,06 μL depois da otimização), assim como o menor volume de injeção (5 μL) diminuem a dispersão extracoluna. Observou-se também que quanto maior a frequência de aquisição de dados do detector e menor tempo de resposta, menor é o alargamento de bandas. Por isso, a princípio, esse parâmetro foi fixado em 20 Hz/0.1 s. Após a otimização instrumental a variância extracoluna diminuiu de 86,6 μL^2 para 24,1 μL^2 usando uracila a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, acetonitrila e solução de fosfato de potássio 10 mM pH 3,0 (55:45) como fase móvel, vazão de 0,1 mL min^{-1} e comprimento de onda igual a 254 nm.

Em seguida, para otimizar a separação dos fármacos antidiabéticos orais, diferentes proporções de acetonitrila e solução fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 3,0 foram testadas (50:50; 55:45 e 60:40). Por fim, a mistura acetonitrila e solução fosfato 10 mM pH 3,0 (50:50) na vazão de 1,5 mL min^{-1} foi definida como fase móvel. O comprimento de onda foi fixado em 230 nm, conforme descrito na monografia da glibenclamida comprimidos. Por meio de espectros dos fármacos (apresentados no item 5.3.1, **Figura 14**) verificou-se que o comprimento de onda 230 nm correspondia, aproximadamente ao máximo de absorção no UV de todos os antidiabéticos em estudo (CL, GZ, GM e GB) e, portanto era adequado para a sua detecção. Por meio da injeção de soluções contendo os fármacos isoladamente, definiu-se a ordem de eluição, conforme mostrado na **Figura 7**.

Na sequência, objetivando reduzir o ruído da linha de base e com isso aumentar a sensibilidade do método, variaram-se a frequência de aquisição de dados e o tempo de resposta. Conforme pode-se observar na **Figura 7**, o ajuste em 20 Hz/0,1 s gera um ruído da linha de base superior ao obtido com 10 Hz/0,5 s. Por outro lado, uma maior frequência de aquisição de dados e um menor tempo de resposta tende a reduzir a variância extracoluna⁸⁷. Entretanto, observa-se também na **Figura 7** que não houve um demasiado alargamento de pico quando o detector foi ajustado em 10

Hz/0,5 s. Portanto, a frequência de aquisição de dados / tempo de resposta do detector escolhida para o método foi de 10 Hz/0,5 s. O método desenvolvido foi utilizado na otimização dos parâmetros do MEPS.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos pela injeção da solução padrão contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fármaco em acetonitrila: água (4:1). A mesma solução foi injetada alterando apenas a frequência de aquisição de dados / tempo de resposta (em que, F10 corresponde a 10 Hz/0,5 s e F20 a 20 Hz/0,1 s). Em (A) observa-se a separação cromatográfica entre os fármacos e, em (B), o ruído da linha de base.



Durante as análises da otimização da extração em plasma, observou-se um aumento significativo na pressão do sistema. Para solucionar o problema, o comprimento da tubulação pré-coluna foi reduzido, conectando o tubo que sai do injetor diretamente na coluna (sem passar pelo forno da coluna). Notou-se redução na pressão. Além da redução da pressão do sistema, observou-se também a possibilidade de obtenção de um método ainda mais rápido com adequada resolução entre os picos. Para tanto, a fase móvel foi alterada, com aumento da proporção de acetonitrila para 60% e a redução da vazão de 1,5 mL min⁻¹ para 1,2 mL min⁻¹. Como consequência da alteração da fase móvel o método se tornou mais rápido, com redução do tempo de corrida em 1 min (de 3,2 min para 2,2 min). A redução no comprimento da tubulação pré-coluna associada a alteração na fase móvel proporcionaram uma redução significativa da pressão do sistema de cerca de 320 bar para aproximadamente 240 bar.

Antes da validação do método, também foi necessário alterar o volume de injeção da amostra com o intuito de aumentar a sensibilidade do método. A área foi aumentada de 55,1 para 224,8 quando 20 µL foram injetados ao invés de 5 µL (utilizando 400 µL de plasma humano contendo 4 µg mL⁻¹ dos analitos na etapa de preparo de amostra). Desta forma, o volume de injeção do método foi fixado em 20 µL. Após a alteração dos parâmetros mencionados o método foi validado para análise de amostras biológicas.

5.2 Otimização das condições para o preparo de amostra por meio de MEPS

Em testes preliminares, utilizando como amostra solução aquosa contendo CL, GZ, GM e GB a 4 µg mL⁻¹, observou-se que, após a etapa de extração do MEPS, parte dos analitos permaneciam na amostra, cerca de 40,4% de CL, 21,3% de GZ, 27,5% de GB e 28,7% de GM não foram extraídos pelo sorvente. Por outro lado, uma boa parcela dos analitos (45,1% para CL, 52,8% para GZ, 38,7% de GM e 42,5% de GB) foi extraída, indicando que o cartucho MEPS C₁₈ foi adequado, porém era necessário otimizar os demais parâmetros com o intuito de melhorar a extração e, posteriormente, a recuperação dos analitos.

As injeções das soluções de lavagem (4 ciclos) indicaram que apenas cerca de 5,1% da CL e 1,4% de GZ (para a amostra de água) e 2,9% de CL (para a amostra de plasma humano) foram eluídos juntamente com a água durante a limpeza do cartucho antes da etapa de dessorção. Os demais analitos (GM e GB) não foram eluídos nessa etapa de limpeza. Além disso, extratos limpos foram obtidos quando plasma humano foi utilizado como amostra. Como não houve uma eliminação excessiva dos analitos e os interferentes foram adequadamente retirados, os 4 ciclos de 100 µL foram definidos para essa etapa do processo.

Nos cromatogramas das soluções de lavagem obtidas após a dessorção dos analitos e antes do reuso do MEPS, não foram encontrados picos no mesmo tempo de retenção dos analitos. Desta forma, o efeito residual entre as extrações não foi observado e a lavagem final foi fixada em 4 ciclos de 100 µL de acetonitrila seguidos de 4 ciclos de 100 µL de água ultrapura.

Além disso, observou-se que um número de ciclos de limpeza relativamente grande (4 ciclos dos solventes de lavagem) era necessário para evitar entupimento do cartucho, e conseqüentemente, aumentar sua vida útil. Os cartuchos foram utilizados cerca de 26 a 125 vezes.

Nos testes preliminares, observou-se que repetibilidade entre as extrações em plasma humano, utilizando a técnica MEPS *offline* (**Tabela 10**).

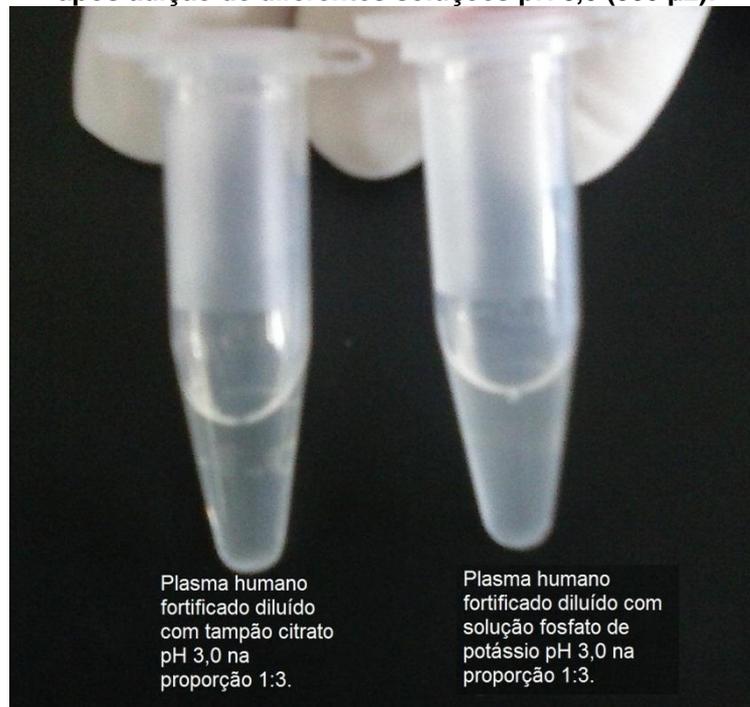
Tabela 10 – Resultados preliminares utilizando MEPS para extração de clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) a partir de plasma humano.

Analito	Área obtida em cada análise			DPR*** entre as áreas
	Dia 1	Dia 2*	Dia 3**	
CL	24,00	27,65	20,62	12,4
GZ	21,55	27,48	21,18	12,5
GM	30,90	38,91	31,03	11,3
GB	32,25	40,51	32,98	11,4

* Cada valor corresponde a média de 3 resultados. ** Cada valor corresponde a média de 2 resultados.*** DPR = desvio padrão relativo.

O pH estudado no PFF⁴⁻¹ foi definido conforme **Tabela 5**, pois notou-se turvação do plasma humano contendo CL, GZ, GM e GB a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ após adição de soluções na faixa de pH entre 3,0 e 5,0. Essa faixa de pH é próxima do ponto isoelétrico da albumina (que é cerca de 4,7) e por isso leva a precipitação de proteínas⁸⁸. Valores de pH inferiores a 2,5 poderiam danificar o material sorvente do MEPS (constituído de sílica ligada a C₁₈) e portanto, não foram utilizados. Ainda com relação às soluções usadas para ajustar o pH da amostra, notou-se maior turvação quando foi utilizada a solução fosfato de potássio ao invés do tampão citrato (**Figura 8**). Quando o tampão citrato pH 3,0 foi utilizado, uma leve turvação foi observada. Porém, usando solução tampão citrato pH 2,5 (ao invés do pH 3,0) a mistura pareceu totalmente límpida. Dessa forma, para evitar o entupimento do cartucho MEPS, a melhor opção foi usar uma solução tampão citrato pH 2,5.

Figura 8– Aspecto de amostras de plasma humano contendo clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (100 μL) após adição de diferentes soluções pH 3,0 (300 μL).



Antes de realizar os testes do PFF⁴⁻¹, algumas extrações em plasma humano foram executadas objetivando avaliar se o uso do tampão citrato pH 2,5 poderia comprometer a extração. Como os valores médios de áreas obtidos (22,78 para CL, 24,73 para GZ, 32,65 para GM e 32,70 para GB) aproximaram-se dos resultados

mostrados na **Tabela 10**. O tampão citrato pH 2,5 foi utilizado nos testes subsequentes.

A acetonitrila foi o solvente escolhido para a eluição dos analitos por ser o solvente constituinte da fase móvel e porque demonstrou, em testes de solubilidade dos fármacos, melhor capacidade de solubilizá-los do que o metanol.

A variável força iônica, a princípio, também seria estudada. Entretanto, assim como descrito para o pH, notou-se turvação da amostra de plasma humano fortificado com os analitos quando pequena quantidade de cloreto de sódio (5% e 10% p/v) foi adicionada.

A recuperação dos analitos foi a variável usada como resposta nos planejamentos experimentais. Os valores de recuperação para cada fármaco e em cada experimento do PFF 2⁴⁻¹ são apresentados na **Tabela 11**. Todos os parâmetros testados nesse planejamento foram estatisticamente significativos (limite de confiança de 95%), entretanto o pH e o volume da amostra foram os parâmetros mais importantes (**Figura 9**). A diluição da amostra, por sua vez, foi o parâmetro menos importante.

Os resultados demonstram uma tendência de alta recuperação em pH 2,5, 15 ciclos de aspiração/ejeção, diluição da amostra de 1:1 e volume da amostra de 100 µL. Tendo em vista que os analitos testados tem pKa próximo a 5,0 (CL 4,71; GZ 6,07; GM 5,1; GB 5,11), em pH 2,5 praticamente todas as moléculas estão na forma não ionizada. Por isso, esse pH foi o mais adequado para a extração dos fármacos. O melhor número de ciclos de aspiração/ejeção da amostra foi 15, pois quanto maior o número de ciclos, mais vezes a amostra contendo os analitos entra em contato com o sorvente e com isso maior tende a ser a extração. Por sua vez, uma baixa diluição (1:1) favoreceu a extração porque permitiu maior concentração dos analitos na amostra do que quando as diluições maiores (1:2 e 1:3) foram utilizadas. O volume de amostra mais baixo (100 µL) foi o que levou a melhor recuperação dos analitos, possivelmente, porque todo o volume da amostra passa mais vezes pelo sorvente do que quando volumes superiores de amostra são empregados. Dessa forma, esses níveis foram fixados, com exceção da diluição da amostra e número de ciclos.

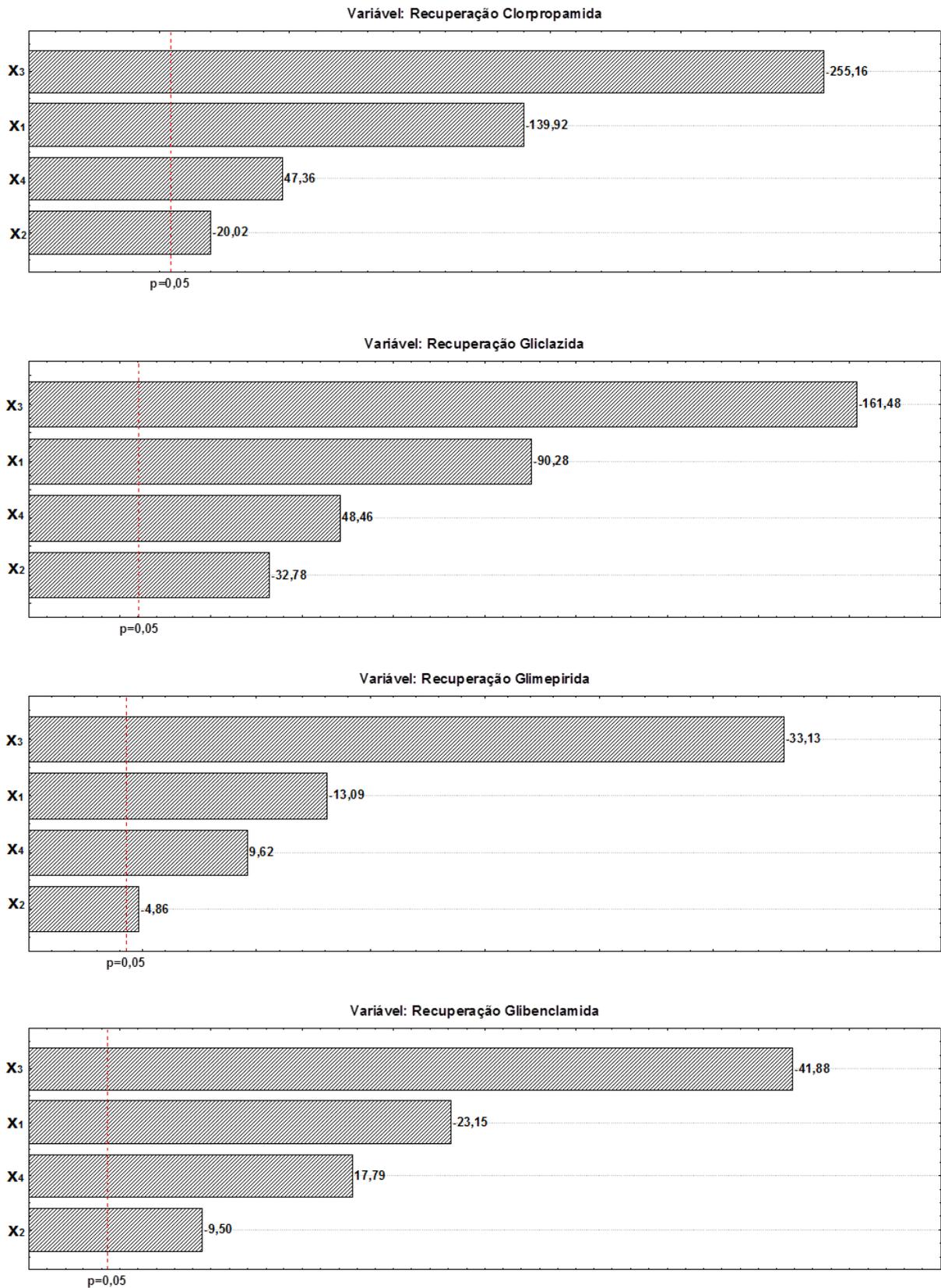
A diluição da amostra foi alterada para 1:2 porque 1:1 gerou uma alta pressão no cartucho MEPS, o que poderia reduzir sua vida útil e entupir os filtros (*frits*) mais rapidamente. Dez ciclos de aspiração/ejeção foram escolhidos ao invés de 15 ciclos objetivando reduzir o tempo e simplificar o procedimento de extração.

Tabela 11 – Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2⁴⁻¹ e para cada fármaco antidiabético oral (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, glimepirida, GM e glibenclamida, GB).

Número do experimento	Variáveis				Recuperação (%)			
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	CL	GZ	GM	GB
1	-1	-1	-1	-1	83	96	95	88
2	1	-1	-1	1	42	73	81	74
3	-1	1	-1	1	95	108	115	114
4	1	1	-1	-1	19	26	28	27
5	-1	-1	1	1	8	30	15	40
6	1	-1	1	-1	0	6	2	4
7	-1	1	1	-1	1	15	4	5
8	1	1	1	1	1	6	2	4
9	0	0	0	0	1	38	29	20
10	0	0	0	0	1	38	24	15
11	0	0	0	0	1	39	29	18

x₁ a x₄ representam as variáveis da etapa de extração, em que, x₁ = volume da amostra, x₂ = diluição da amostra, x₃ = pH da solução tampão, x₄ = número de ciclos de aspirações e ejeções. -1 = nível inferior da variável, 0 = ponto central, +1 = nível superior da variável.

Figura 9 - Gráficos de pareto obtidos pelo PFF 2⁴⁻¹ mostrando as variáveis (x₁, x₂, x₃, x₄) que afetam a etapa de extração dos antidiabéticos orais.



Em que (x₁) = volume da amostra, (x₂) = diluição da amostra, (x₃) = pH da solução tampão, (x₄) = número de ciclos de aspirações e ejeções.

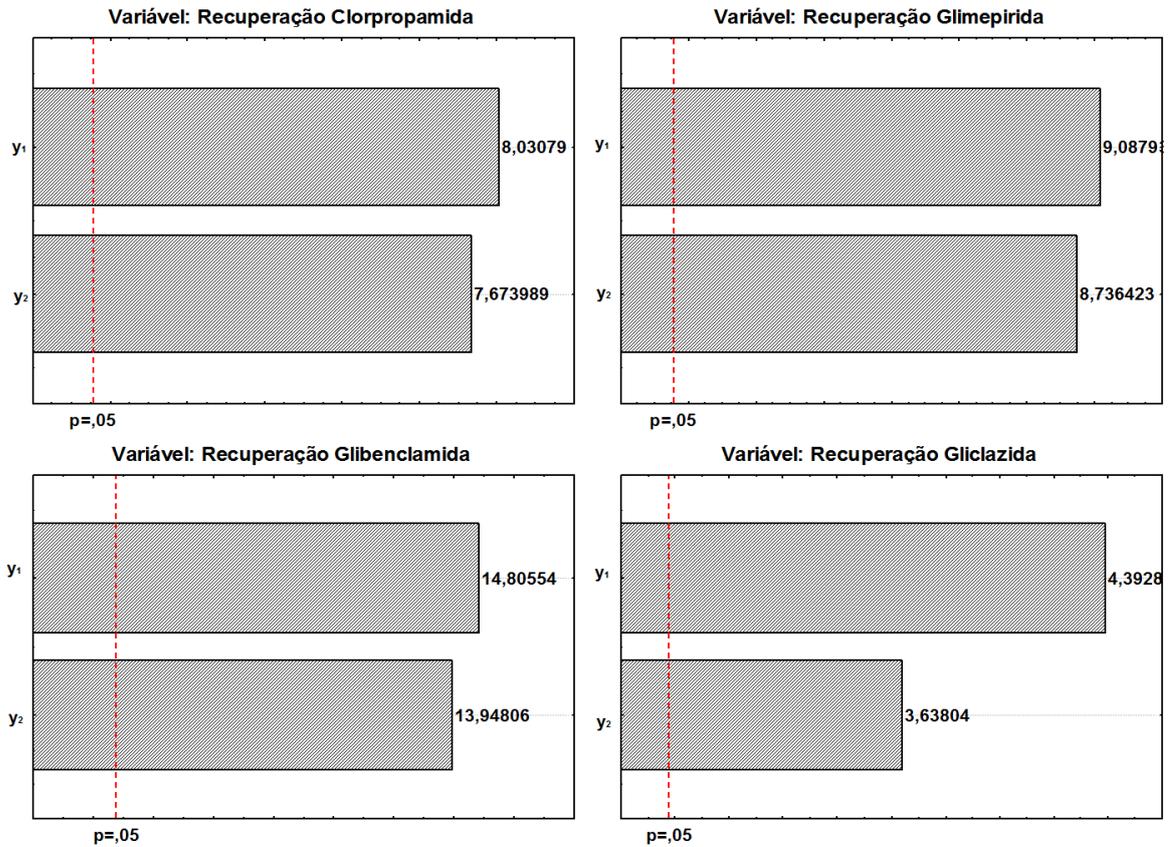
No planejamento experimental para a etapa de dessorção, ambos os parâmetros avaliados (porcentagem de acetonitrila e número de ciclos de aspirações do eluente através do cartucho) foram significativos a 95% de confiança, sendo que o melhor resultado foi encontrado em maiores porcentagens de acetonitrila e quando um maior número de aspirações do eluente através do cartucho foi aplicado (**Tabela 12** e **Figura 10**). A **Figura 11** evidencia que quanto maior a porcentagem de acetonitrila e quanto maior o número de ciclos de aspirações do eluente através do cartucho maior é a recuperação dos analitos. Entretanto, o uso de 4 ciclos de 100% de acetonitrila não seria interessante por dois motivos. O primeiro é o grande volume de solvente necessário, no total de 200 µL de acetonitrila. O segundo motivo é que essa grande proporção de acetonitrila não permitiria a injeção direta da amostra (analito dessorvido na acetonitrila) no cromatógrafo a líquido, necessitando de uma etapa adicional de diluição com água apenas para correção da força da amostra. Ainda, de acordo com a curva de níveis dos fármacos (**Figura 11**), observa-se que com 70% de acetonitrila e 3 ciclos de aspiração/ejeção de 50 µL, uma alta recuperação pode ser obtida. Nessa condição, no mínimo 70% de recuperação dos fármacos é esperado. Além disso, um menor volume de dessorção (150 µL ao invés de 200 µL) possibilita maior concentração dos analitos na amostra após dessorção e com isso favorece sua detecção no UV. Dessa forma, essas condições (3 x 50 µL de 70% de acetonitrila) foram definidas para os próximos testes.

Tabela 12 - Recuperação obtida em cada experimento do PFC 2² e para cada fármaco antidiabético oral (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, glimepirida, GM, e glibenclamida, GB).

Número do experimento	Replicata	Variáveis		Recuperação (%)			
		y ₁	y ₂	CL	GZ	GM	GB
1	1	-1	-1	58	78	81	82
2	1	1	-1	75	92	102	98
3	1	-1	1	71	92	100	95
4	1	1	1	104	106	126	125
5	2	-1	-1	68	88	87	86
6	2	1	-1	72	88	99	96
7	2	-1	1	74	93	100	96
8	2	1	1	106	105	120	124

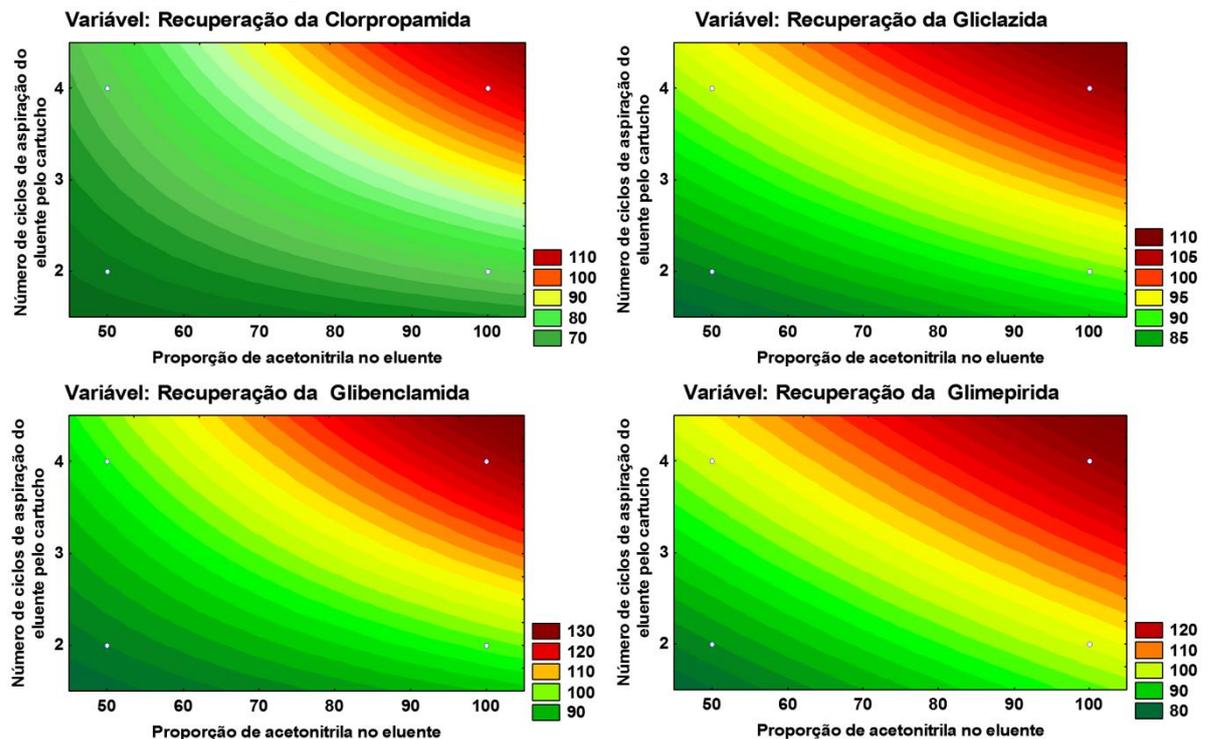
y₁ e y₂ representam as variáveis da etapa de dessorção, em que, y₁ = proporção de acetonitrila, y₂ = número de ciclos de aspiração e ejeção. -1 = nível inferior da variável, +1 = nível superior da variável.

Figura 10 - Gráficos de pareto obtidos pelo PFC 2² mostrando as variáveis (y_1 e y_2) que afetam a etapa de dessorção dos antidiabéticos orais.



Em que, y_1 = proporção de acetonitrila e y_2 = número de ciclos de aspiração e ejeção.

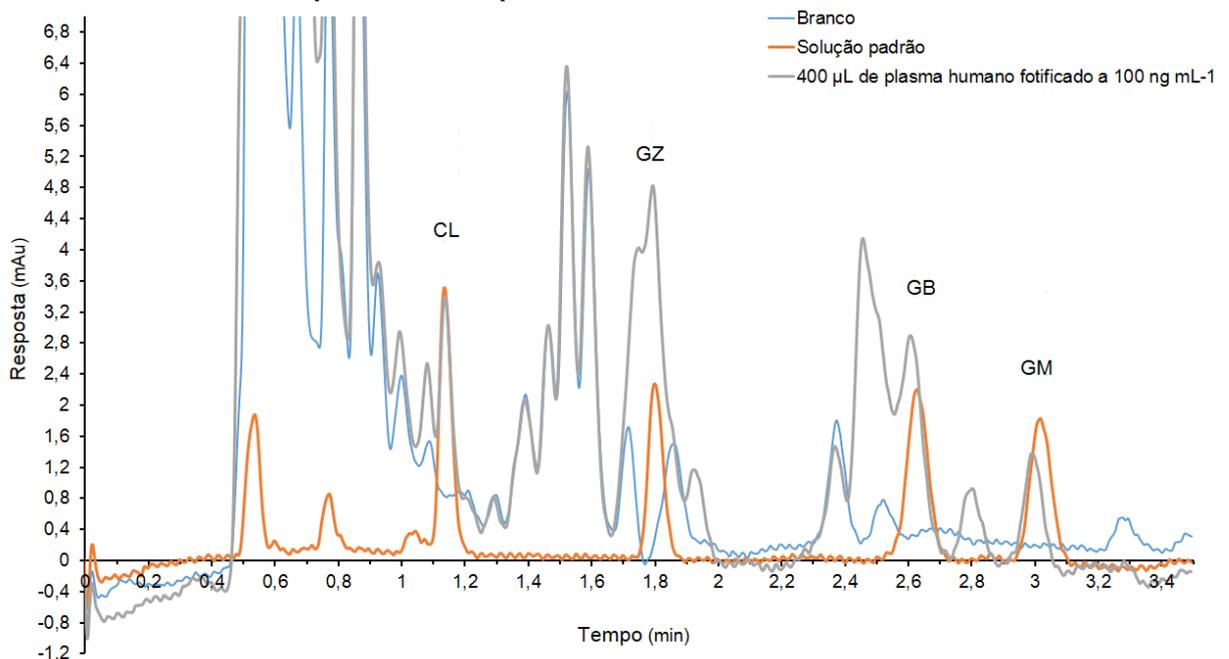
Figura 11 – Curva de níveis obtida através do PFC 2².



Baseado no planejamento experimental, 100 μL de amostra de plasma foi a condição que mostrou maior recuperação. Visando aumentar a detectabilidade dos fármacos e permitir sua aplicação em amostras de voluntários, testes univariados foram executados. Observou-se que 400 μL de amostra de plasma levam a uma maior sensibilidade, aumentando a área dos picos cromatográficos dos fármacos em média de 2,13 vezes (de 105 para 225 quando 20 μL foram injetados). A recuperação dos analitos usando 400 μL de amostra, por sua vez, foi reduzida de 116% para 58% (em média).

Em seguida, foram realizadas análises utilizando 400 μL de amostra de plasma humano fortificado com CL, GZ, GM e GB a 100 ng mL^{-1} com o objetivo de avaliar a se esse volume seria adequado ao método bioanalítico, tendo em vista as baixas concentrações plasmáticas desses analitos em usuários dos antidiabéticos orais. Apesar da redução da recuperação pela metade, o maior volume de amostra (400 μL) foi escolhido porque permitiu melhor detecção de todos os analitos (CL, GZ, GM e GB) mesmo em concentrações baixas (**Figura 12**).

Figura 12 – Cromatogramas do plasma branco, solução padrão 100 ng mL^{-1} e amostra de plasma humano fortificado a 100 ng mL^{-1} usados na avaliação do volume de amostra que permitiria adequada sensibilidade ao método.



Nota-se pela **Figura 12** que GM a 100 ng mL^{-1} poderia ser quantificada por este método, uma vez que não há picos interferentes no mesmo tempo de retenção e a relação sinal ruído é superior a 10. Devido à grande interferência no tempo de retenção da GB e a sua baixa concentração plasmática normalmente encontrada em humanos, a aplicação do método para quantificação desse fármaco não seria possível. Com base neste resultado e levando-se em consideração a similaridade entre os quatro fármacos estudados, a GB foi definida como PI. Além disso, é importante ressaltar que como os fármacos antidiabéticos orais em estudo não são administrados simultaneamente na terapêutica. Dessa forma, GB não estará presente em amostras de pacientes usuários dos demais fármacos (CL, GZ e GM) e, portanto, é adequada como PI. Para os fármacos CL e GZ foram observados alguns picos interferentes que prejudicariam a suas respectivas quantificações na concentração 100 ng mL^{-1} . Por isso, optou-se por aumentar a concentração do limite inferior da faixa de trabalho de CL e GZ para 1000 ng mL^{-1} . Essa concentração de CL e GZ pode ser encontrada em amostras de pacientes (conforme C_{max} descrito no item 2.1.1.1). O aumento do LIQ de CL e GZ permitiu obter relação sinal ruído superior a 10.

Assim, o procedimento definido para a extração foi: amostra de plasma humano fortificado com solução de trabalho do PI na proporção 400:20 (v/v) foram agitados vigorosamente por 30 s e centrifugados a $480 \times g$ por 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi filtrado em membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e transferido para um tubo limpo. Depois, $420 \text{ }\mu\text{L}$ de plasma contendo o PI foram pipetados e diluídos com $780 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão citrato pH 2,5 (1:2). A amostra com tampão foi agitada por 1 min antes da etapa de extração. Em seguida, a amostra foi manualmente aspirada e ejetada pelo sorvente do MEPS (10 ciclos de $100 \text{ }\mu\text{L}$). Na sequência, o sorvente foi lavado com água ($4 \times 100 \text{ }\mu\text{L}$) para remover interferentes e os analitos foram dessorvidos com $150 \text{ }\mu\text{L}$ de 70% de acetonitrila em água ($3 \times 50 \text{ }\mu\text{L}$). Antes de ser reutilizado, o sorvente foi lavado/recondicionado com $4 \times 100 \text{ }\mu\text{L}$ de acetonitrila pura seguido por $4 \times 100 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura.

O tempo de preparo de cada amostra foi de cerca de 10 minutos. O processo pelo modo *offline* mostrou ser reativamente lento quando comparado com dados da literatura para MEPS *online* e quando técnicas mais sensíveis como LC-MS/MS são

empregadas. Menores volumes de amostra e solventes (do que os obtidos neste trabalho), possivelmente, seriam necessários caso uma técnica de detecção mais sensível fosse utilizada. Nesse caso, um menor número de ciclos provavelmente poderia ser empregado, com conseqüente diminuição do tempo de análise. O uso do dispositivo MEPS *online*, a princípio, também tornaria o método mais rápido, pois as etapas de preparo de amostra e separação cromatográfica poderiam ser executadas ao mesmo tempo. Outra vantagem do dispositivo MEPS *online* em relação ao modo *offline* é a possibilidade de programação de todo o processo. Isso permite um adequado ajuste do fluxo da amostra e soluções pelo MEPS, facilitando a eluição e evitando erros de manipulação. Entretanto, o método desenvolvido mostrou grandes vantagens em relação às técnicas convencionais de preparo de amostra, tais como praticidade e eficiência na retirada de interferentes da matriz.

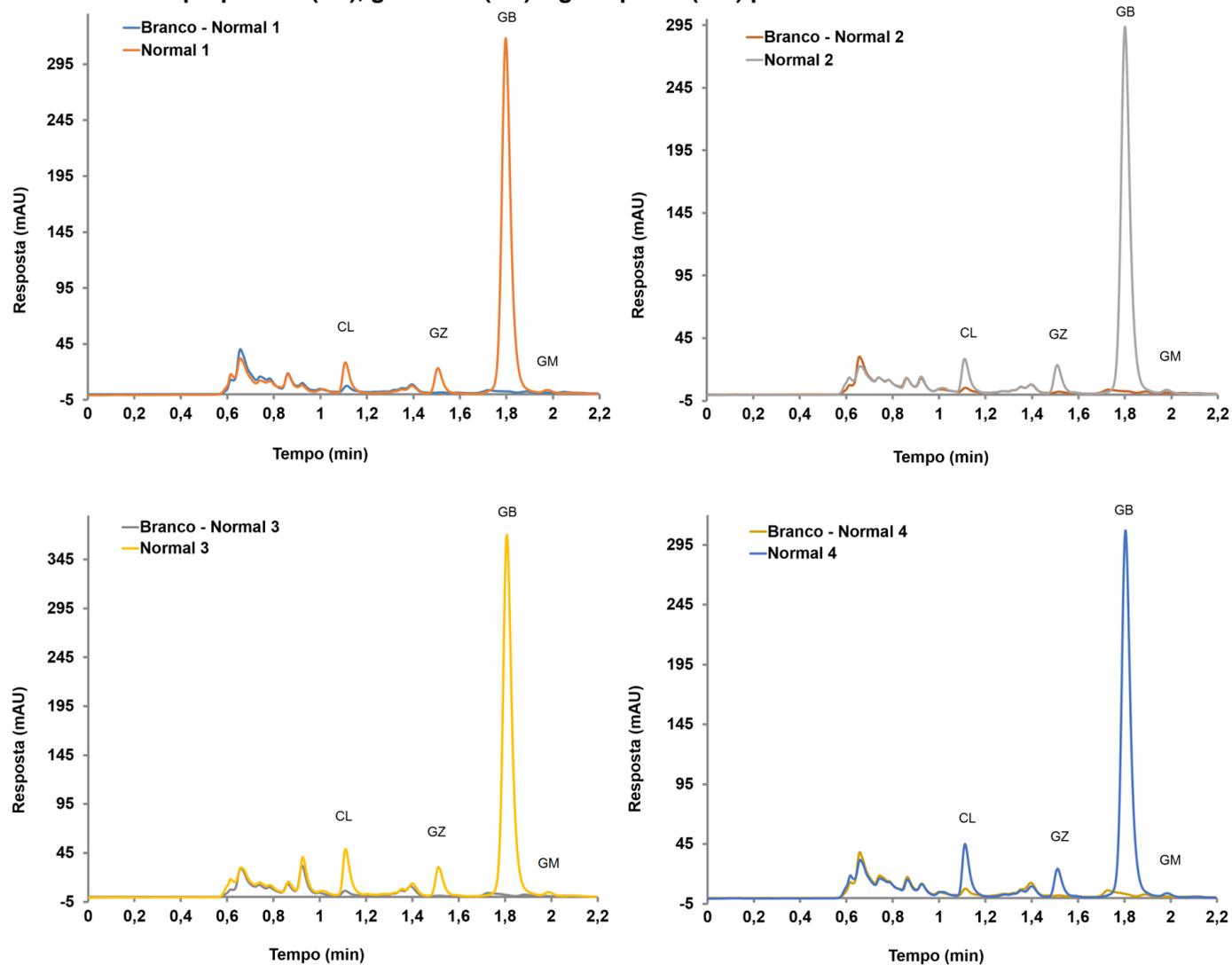
5.3 Validação do método bioanalítico

5.3.1 Seletividade

Picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (CL, GZ e GM) mostraram respostas (área do pico) menores que 20% da área obtida com amostras na concentração do LIQ. De forma semelhante, picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI mostraram resposta menor que 5%. Na **Figura 13**, é apresentada a sobreposição dos cromatogramas obtidos da amostra branco e amostras de plasma fortificado na concentração do LIQ e nas diferentes matrizes (Normal 1, Normal 2, Normal 3, Normal 4, Lipêmico, Hemolisado Ha e Hemolisado Hb). Nota-se que em nenhuma das amostras foram observados muitos picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos.

Objetivando identificar os picos de CL, GZ, GM e GB, espectros na região do UV de amostras fortificadas no nível de concentração do LIQ foram obtidos e comparados com os espectros de soluções padrão no nível de CQB (**Figura 14**). A similaridade entre os espectros das amostras e dos padrões permitiram a identificação dos picos dos fármacos e a confirmação da seletividade do método.

Figura 13 – Cromatogramas obtidos a partir de plasma branco e amostras de plasma fortificadas com os fármacos clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM) para fins de teste seletividade.



/continua

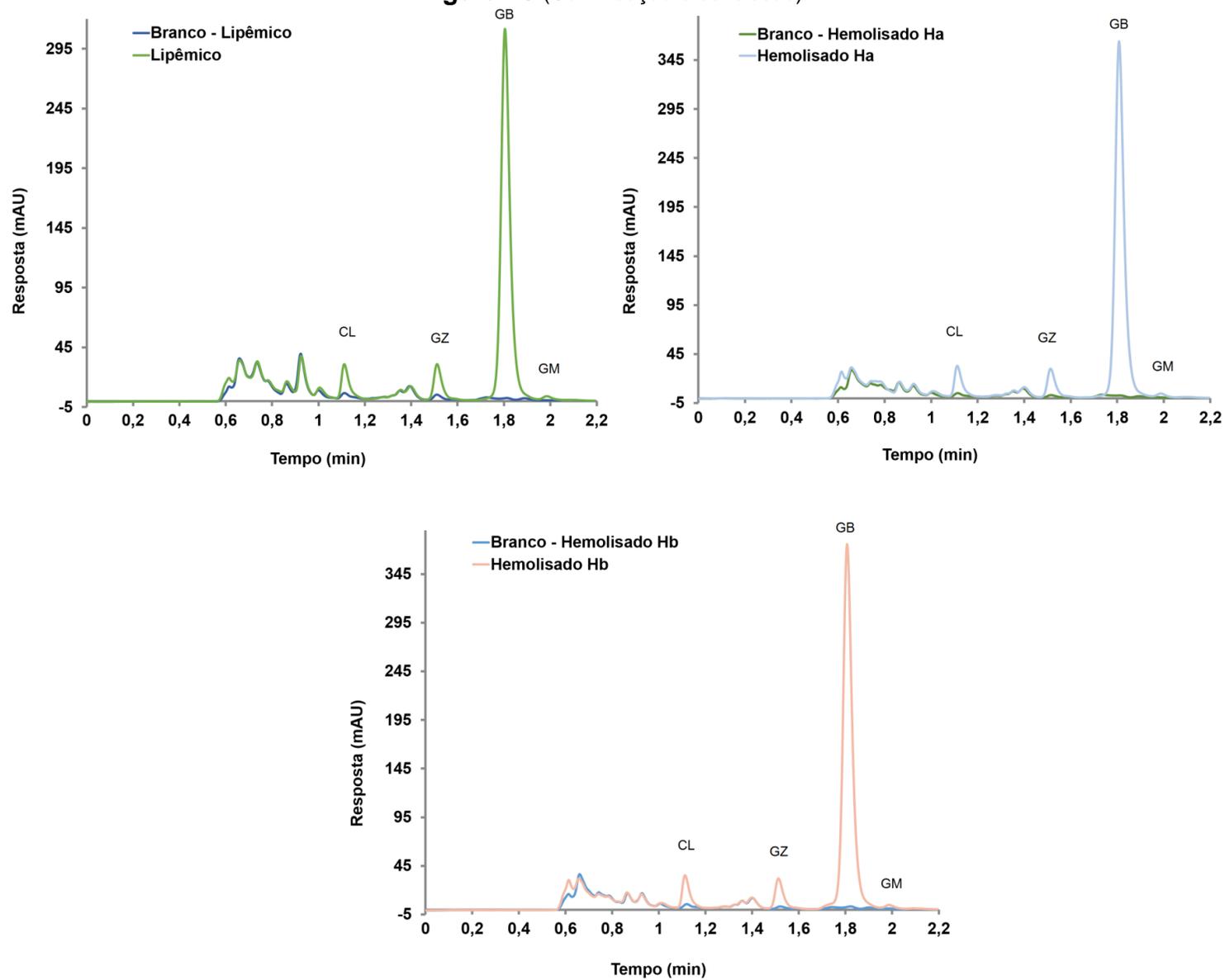
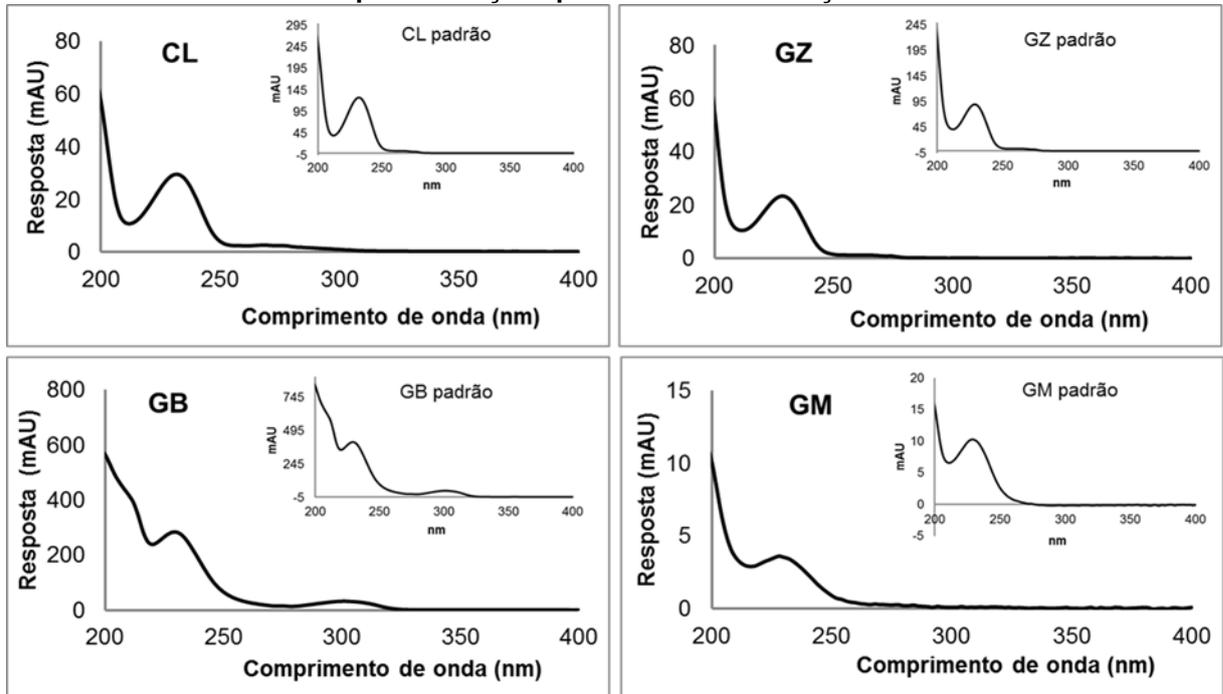
Figura 13 (Continuação e conclusão)

Figura 14 – Espectros UV obtidos de uma amostra fortificada com clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e glibenclamida (GB) no nível LIQ e os respectivos espectros obtidos pelas soluções padrão na concentração de CQB.



5.3.2 Efeito residual

Conforme apresentado na **Figura 15**, todas as injeções do plasma branco, antes e depois da injeção do plasma fortificado na concentração do LSQ, foram semelhantes. Além disso, as respostas dos picos interferentes foram menores que 20% que as respostas do plasma fortificado na concentração do LIQ para CL, GZ e GM, e menor que 5% para o PI (**Figura 16**).

Figura 15 – Cromatogramas das injeções da amostra branco, sendo a primeira injeção do branco antes da injeção do LSQ e a segunda e a terceira injeções do branco após a injeção do LSQ.

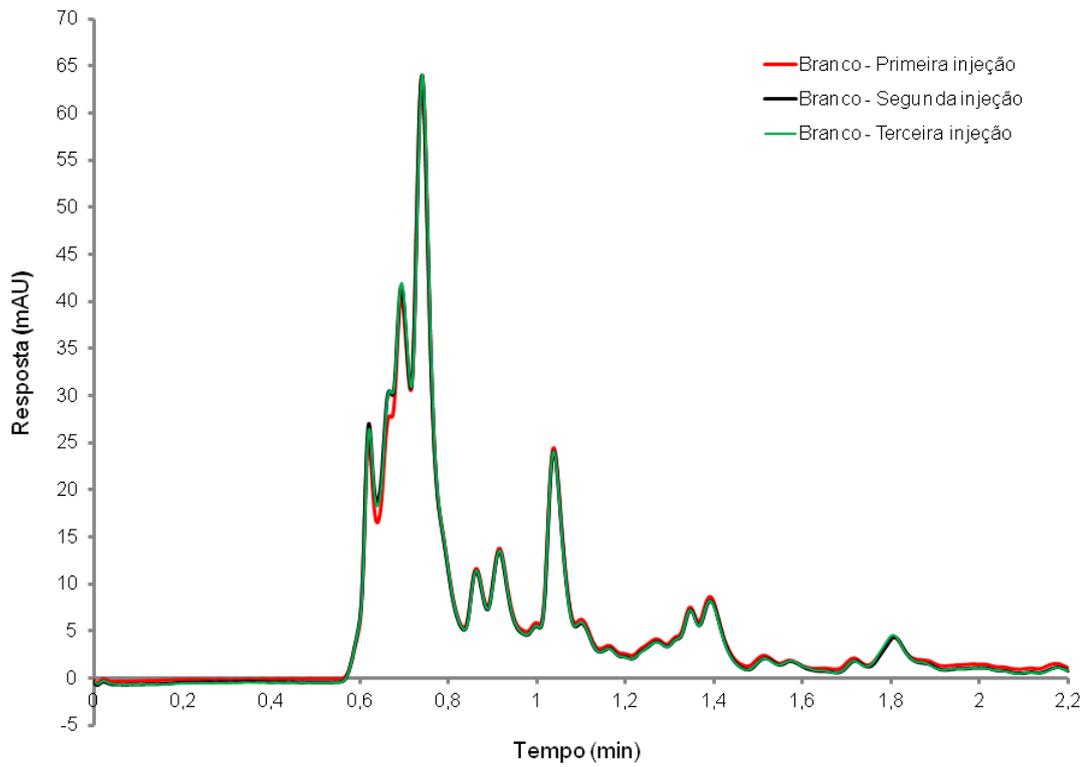
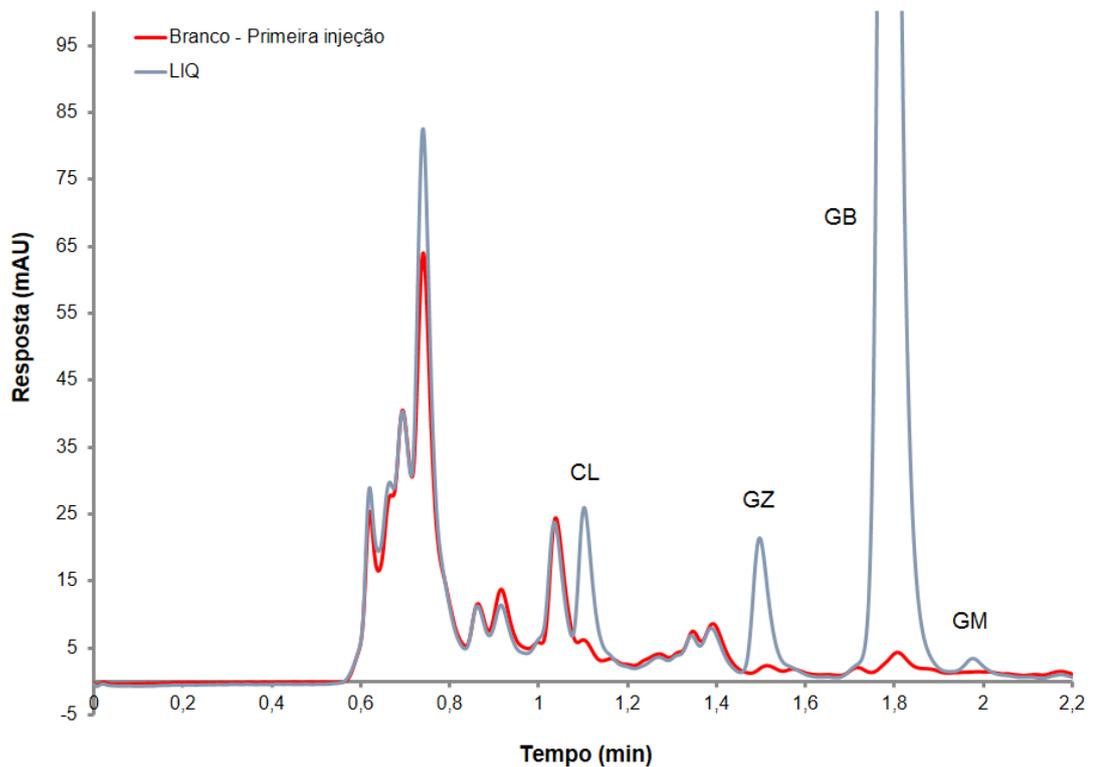


Figura 16 – Cromatogramas da primeira injeção do branco e do LIQ (em que CL = clorpropamida, GZ = gliclazida, GM = glimepirida e GB = glibenclamida).



5.3.3 Linearidade

Todas as curvas de calibração ($y = ax + b$) obtidas em plasma humano para CL, GZ e GM pela construção do gráfico concentração do fármaco (x , $\mu\text{g mL}^{-1}$) versus razão entre a resposta da área do pico do fármaco (CL, GZ ou GM) e a resposta da área do pico do PI (y) foram lineares na faixa testada para cada analito (**Tabela 13**). De acordo com a legislação vigente, padrões da curva de calibração são aceitos quando um desvio da concentração nominal é menor que 20% para LIQ e 15% para outros níveis. Pelo menos 75% das respostas dos padrões de calibração mostraram seguir esse critério. Os resultados do método proposto satisfizeram aos requisitos. Além disso, os coeficientes de determinação (r^2) foram maiores que 0,9903.

Tabela 13 - Parâmetros de linearidade obtidos para cada fármaco antidiabético oral (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, e glimepirida, GM).

Analito	Dia de análise	Faixa de trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inclinação da reta (a)	Intercepto (b)	r^2
CL	1	1,0 – 50,0	0,0675	0,0119	0,9994
	2		0,0726	-0,0128	0,9980
	3		0,0740	0,0193	0,9973
GZ	1	1,0 – 10,0	0,0647	0,0056	0,9973
	2		0,0670	0,0052	0,9936
	3		0,0667	-0,0010	0,9985
GM	1	0,1 – 1,0	0,0811	0,0044	0,9957
	2		0,0832	-0,0024	0,9903
	3		0,0838	-0,0031	0,9953

5.3.4 Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão (intracorrída e intercorrída) são apresentados na **Tabela 14**. Todos os valores foram menores que o limite de 20% para LIQ e 15% para os níveis CQB, CQM, CQA e CQD. O maior valor obtido

no teste precisão foi de 14,4% quando amostras de CQB foram analisadas (no segundo dia de análise e para o analito CL). No teste de exatidão foram observados desvios de até -17,8% (dia 1, CL) e 14,7% (dia 3, CL no nível CQB) em relação ao valor nominal das amostras de LIQ e das amostras de controle de qualidade, respectivamente.

Alguns desvios em relação ao valor nominal no teste de exatidão (calculado como erro padrão relativo, ERP, conforme RDC 27/2012) foram negativos, indicando que algumas amostras apresentam concentração inferior à nominal, e, portanto, a exatidão é inferior a 100%. Da mesma forma, os valores positivos significam que algumas amostras testadas apresentaram concentração superior ao nominal, logo, a exatidão é maior que 100%.

Tabela 14 - Resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão para os fármacos antidiabéticos orais (clorpropamida, CL, gliclazida, GZ, e glimepirida, GM).

Analito	Nível de concentração	Precisão (DPR%)				Exatidão (EPR%)			
		Intracorrida			Intercorrida	Intracorrida			Intercorrida
		Dia 1*	Dia 2*	Dia 3*		Dia 1*	Dia 2*	Dia 3*	
CL	LIQ	3,8	5,7	3,8	11,3	-17,8	-14,6	6,8	8,5
	CQB	5,5	14,4	3,0	9,4	4,5	9,2	14,7	-9,5
	CQM	1,0	4,0	5,6	5,6	-6,1	2,4	-6,6	3,4
	CQA	1,0	4,7	4,3	3,8	-6,3	-4,3	-8,2	6,3
	CQD	4,9	2,9	2,3	8,4	-9,1	8,8	-3,3	1,2
GZ	LIQ	1,9	8,2	6,7	10,0	-5,5	10,5	-7,3	0,8
	CQB	1,4	3,7	2,1	6,3	-14,4	0,5	-6,8	6,9
	CQM	0,8	8,1	4,2	8,5	-2,7	8,7	-7,8	0,6
	CQA	1,2	3,3	2,6	4,4	-2,8	-1,0	-9,7	4,5
	CQD	7,7	2,2	2,3	9,0	-0,4	14,5	-1,0	-4,4
GM	LIQ	5,1	5,2	12,1	7,6	-16,1	-6,1	-14,8	12,3
	CQB	2,2	2,6	1,8	5,5	-8,3	1,7	-10,4	5,7
	CQM	1,8	9,2	0,8	8,2	-8,4	6,7	-7,8	3,2
	CQA	1,0	5,6	0,8	5,4	-3,3	1,0	-10,3	4,2
	CQD	3,0	1,0	0,5	6,7	10,2	9,9	-2,4	-5,9

*Cada valor é a média de 5 valores independentes.

5.3.5 Recuperação

A **Tabela 15** mostra os resultados da recuperação dos analitos. Kim *et al.* (2004) compararam diferentes técnicas de preparo de amostra na análise de GM em plasma humano. De acordo com estes autores a recuperação a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi de 77,1% e 85,4% quando LLE e SPE foram utilizados, respectivamente⁸⁰. Conforme descrito na **Tabela 15**, a recuperação média da GM a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQB) foi 71,9%, valores aproximados dos encontrados no trabalho de Kim *et al.* (2004) para LLE e para SPE.

Tabela 15 - Recuperação da clorpropamida (CL), gliclazida (GZ), glimepirida (GM) e do PI glibenclamida (GB) de acordo com o nível de concentração.

Analito	Nível de concentração	Recuperação (%)*	DPR (%)
CL	CQB	45,8	0,02
	CQM	37,2	0,07
	CQA	46,7	0,44
GZ	CQB	59,4	0,31
	CQM	50,2	0,18
	CQA	52,6	0,59
GM	CQB	71,9	3,25
	CQM	50,6	0,15
	CQA	49,3	0,56
GB (PI)	-	50,4	0,33

* Cada valor é a média de 3 valores (injeções diferentes da mesma amostra extraída).

Os dados da **Tabela 15** estão de acordo com a recuperação obtida quando $400 \mu\text{L}$, ao invés de $100 \mu\text{L}$, foi usado na otimização do MEPS. Valores de recuperação próximos a 100% e valores inclusive superiores aos encontrados na literatura (conforme **Tabela 3**) poderiam ser obtidos (em outras condições, como mostrado na **Figura 11**) utilizando MEPS como técnica de preparo de amostra. Entretanto, visando aumentar a sensibilidade do método e permitir sua aplicação em amostras de pacientes, $400 \mu\text{L}$ foi escolhido. Como consequência a recuperação foi menor,

porém a área aumentou e isso possibilitou a quantificação dos fármacos em amostras de plasma de voluntários.

Na **Tabela 15** observa-se também que a recuperação do PI foi semelhante à dos fármacos CL, GZ e GM. Isso mostra que os quatro analitos se comportam de forma parecida durante a extração pelo MEPS, e portanto, GB é um adequado PI.

5.3.6 Estabilidade

Na **Tabela 16** são apresentados os resultados obtidos para a estabilidade dos fármacos CL, GZ e GM em plasma humano. Observa-se que todos os resultados obtidos para CQB e CQA atenderam ao limite máximo de desvio de 15% da média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal, conforme determinado na legislação vigente. Dessa forma, os analitos são estáveis nas condições testadas.

Tabela 16 – Estabilidade dos fármacos clorpropamida (CL), glimepirida (GM) e gliclazida (GZ) em plasma humano.

Estabilidade	Fármaco	EPR obtido em cada concentração*	
		CQB	CQA
Curta duração	CL	0,0356	-0,0429
	GZ	0,0774	0,0384
	GM	-0,2138	-0,1661
Após ciclos congelamento / descongelamento	CL	-0,0306	0,0590
	GZ	0,0723	0,1781
	GM	-0,2392	-0,1198
Pós-processamento	CL	0,0803	0,0584
	GZ	0,0778	0,0622
	GM	-0,0963	-0,0629
Longa duração	CL	-0,2126	-0,0925
	GZ	0,0411	-0,0465
	GM	-0,2334	-0,1604

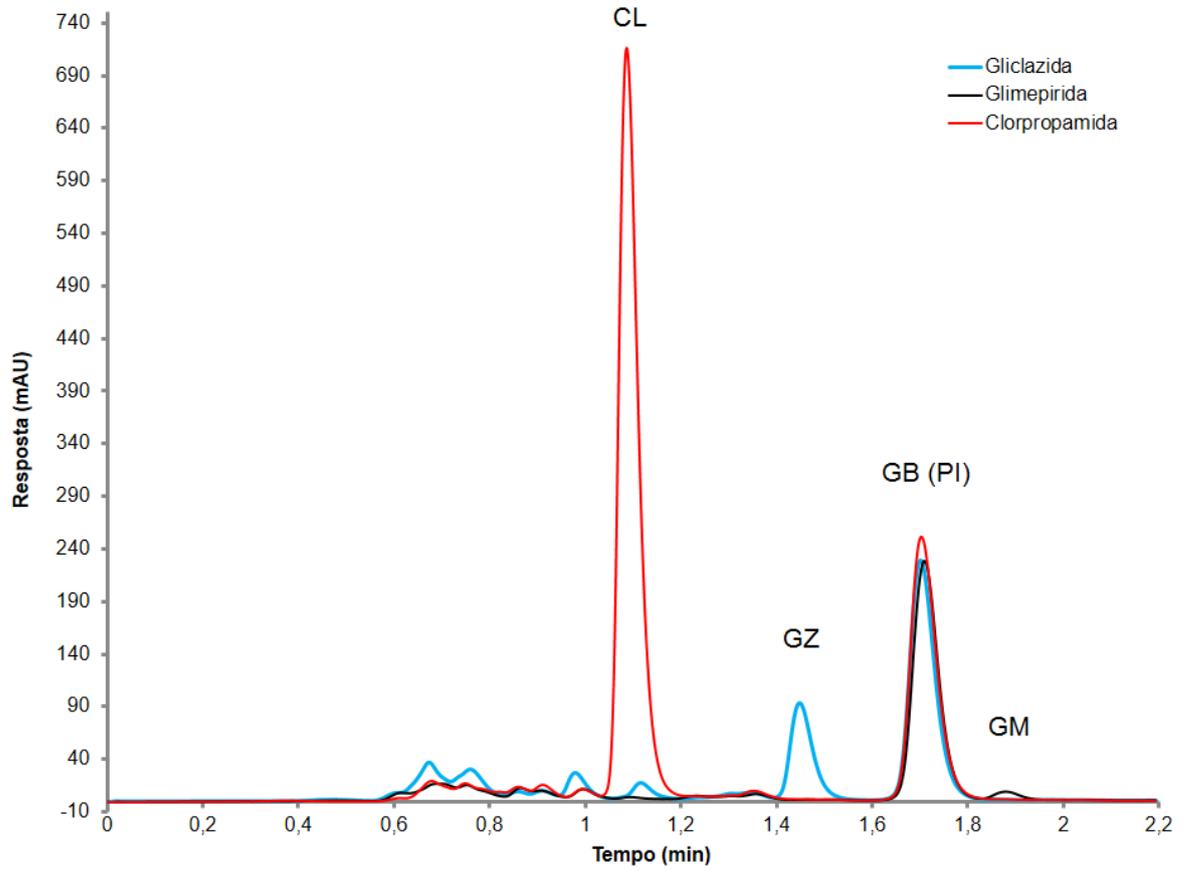
* EPR = erro padrão relativo.

Além disso, as soluções de maior e menor concentração mostraram ser estáveis por pelo menos 40 dias e a 4 °C (com exceção da solução estoque mais concentrada da CL), pois não se observou desvio superior a 10% das respostas obtidas a partir das soluções armazenadas em relação às respostas das soluções recém preparadas. A solução estoque mais concentrada da CL foi estável por 33 dias, atendendo aos critérios citados. As soluções estoques e de trabalho do PI foram estáveis também por 33 dias.

5.4 Aplicação do método

Após ser validado, o método foi aplicado a três amostras de voluntários que fizeram uso de cada um dos fármacos. Os tempos de coleta foram escolhidos de acordo com dados da literatura (descritos no item 2.1.1.1). Optou-se por realizar a coleta próximo ao t_{max} de cada fármaco após administração da dose recomendada para cada um (também descrita no item 2.1.1.1). A concentração de CL foi de 20,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que essa amostra foi coletada 2 h após a administração de um comprimido contendo 250 mg do fármaco. Na outra amostra, 5,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GZ foi encontrado após 6 horas da administração de 90 mg via oral. A terceira amostra, por sua vez, foi coletada 3 h após a administração de comprimido contendo 4 mg de GM, na qual foi encontrado 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do fármaco na amostra de plasma. A **Figura 17** mostra os cromatogramas dos fármacos CL, GZ e GM obtidos pela aplicação do método em amostras de voluntários.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos na análise de três amostras de voluntários que fizeram uso dos fármacos antidiabéticos orais clorpropamida (CL), gliclazida (GZ) e glimepirida (GM).



6 CONCLUSÃO

O planejamento experimental usado nas etapas de extração e dessorção orientou a seleção racional dos melhores níveis para cada parâmetro e suas possíveis interações, sendo necessários relativamente poucos experimentos.

MEPS mostrou ser uma técnica adequada para o preparo de amostras de plasma contendo os fármacos antidiabéticos orais clorpropamida, gliclazida e glimepirida a partir de volumes relativamente pequenos e empregando quantidades reduzidas de solventes orgânicos comparativamente às técnicas convencionais. Além disso, cada cartucho foi reutilizado por até 125 vezes, uma grande vantagem econômica quando comparada à técnica SPE. Também, o método desenvolvido permitiu a concentração dos fármacos antidiabéticos orais em amostras de plasma, sem necessitar de uma etapa adicional, como a evaporação de solventes, que é comumente usada. Também, MEPS associou extração e limpeza da amostra em apenas uma etapa. O procedimento de extração pelo MEPS mostrou ser prático e levou a altos valores de recuperação dos analitos. Ademais, os interferentes foram adequadamente retirados da matriz.

O uso de uma coluna de núcleo fundido permitiu o desenvolvimento de uma corrida cromatográfica rápida com adequada separação dos fármacos em menos de 2,2 min. O método desenvolvido foi validado e mostrou ser adequado para aplicação em amostras de plasma humano.

Dessa forma, um método eficiente e simples foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de clorpropamida, gliclazida e glimepirida em plasma humano. MEPS mostrou ser uma técnica moderna com grandes vantagens frente às demais técnicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet n. 312, 2013**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>. Acesso em 10 dez. 2013.
- 2 BRASIL. Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica nº 36: Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica - Diabetes Mellitus**. Brasília, 2013, 160 p.
- 3 FERNANDES, C. *et al.* Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 2, p. 217-223, mar. 2007. ISSN 1570-0232.
- 4 MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC GC-Magazine of Separation Science**, v. 9, n. 1, p. 16-&, jan. 1991. ISSN 0888-9090.
- 5 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-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 801, n. 2, p. 317-321, mar. 2004. ISSN 1570-0232.
- 6 FERREIRA, C. L. R. A.; FERREIRA, M. G. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde - análise a partir do sistema HiperDia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n.1, p. 80-86, 2009.
- 7 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of Medical Care in Diabetes**, v. 36, suplemento 1, 2013, 55 p.
- 8 LEBOVITZ, H. E. Type 2 diabetes mellitus-current therapies and the emergence of surgical options. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 7, p. 408-419, jul. 2011. ISSN 1759-5029.
- 9 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2**. Washington, 2008, 80 p.
- 10 BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman As Bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed, p. 1478. New York: McGraw, 2006.
- 11 WANNMACHER, L. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde - Brasil. **Uso racional de medicamentos: temas**

- relacionados. Antidiabéticos orais: comparação entre diferentes intervenções**, v. 2, n. 11. Brasília, out. 2005, 6 p. ISSN 1810-0791.
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. Brasília, 2010, 249 p.
- 13 O'NEIL, M. J. *et al.* **The Merck Index**. NJ, USA: Merck Research Laboratories, 2006.
- 14 DRUG BANK. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 14 jan. 2014.
- 15 SCIFINDER. American Chemical Society. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org>>. Acesso em: 14 jan. 2014.
- 16 MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, v. 2, p. 792-793 e 1078-1081. London: Pharmaceutical Press, 2004.
- 17 BAKARE, M. T.; MUSTAPHA, A.; ABDUAGUYE, I. An improved high-performance liquid-chromatographic determination of chlorpropamide in human plasma. **Chromatographia**, v. 39, n. 1-2, p. 107-109, jul. 1994. ISSN 0009-5893.
- 18 ODUNOLA, M. T. B. *et al.* Rapid high performance liquid chromatographic determination of chlorpropamide in human plasma. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 12, p. 1378-1381, jun. 2007. ISSN 1684-5315.
- 19 KIM, H.; YUN, M.; KWON, K. I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of gliclazide in healthy volunteers. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 7, p. 564-568, jul. 2003. ISSN 0253-6269.
- 20 GLOWKA, F. K.; HERMANN, T. W.; ZABEL, M. Bioavailability of gliclazide from some formulation tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, n. 1-2, p. 71-77, out. 1998. ISSN 0378-5173.
- 21 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, n. 5, p. 394-401, jun. 2005. ISSN 0269-3879.
- 22 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, n. 3-4, p. 653-657, maio 2002. ISSN 0731-7085.
- 23 CASSIANO, N. M. *et al.* 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, n. 7-8, p. 1462-1469, abril 2006. ISSN 1618-2642.
- 24 CHANG, M. S. *et al.* Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: Pros and cons. **Drug Development Research**, v. 68, n. 3, p. 107-133, maio 2007. ISSN 0272-4391.
- 25 SANTOS-NETO, A. J. *et al.* Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2, p. 71-76, fev. 2006. ISSN 0021-9673.
- 26 LANÇAS, F. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. São Carlos: Rima, 2004.
- 27 KOLE, P. L. *et al.* Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p. 199-217, jan.-fev. 2011. ISSN 0269-3879.
- 28 QUEIROZ, S. C. N.; CAROL H.; COLLINS, I. C. S. F. J. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
- 29 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, ed. 2, p. 110.
- 30 LI, K. M.; RIVORY, L. P.; CLARKE, S. J. Solid-phase extraction (SPE) techniques for sample preparation in clinical and pharmaceutical analysis: A brief overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 95-102, maio 2006. ISSN 1573-4129.
- 31 RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, jan. 20 2012. ISSN 0021-9673.
- 32 CANDISH, E. *et al.* A simplified approach to direct SPE-MS. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2399-2406, sep. 2012. ISSN 1615-9306.
- 33 RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 359-366, fev. 2012. ISSN 1615-9306.
- 34 LAHOUTIFARD, N.; DAWES, P.; WYNNE, P. **Micro extraction packed sorbent (MEPS): analysis of food and beverages**. Produzido por SGE Analytical Science. Disponível em: <<http://www.sisweb.com/lc/sge/meps.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2014.
- 35 URBANOWICZ, M.; ZABIEGALA, B.; NAMIESNIK, J. Solventless sample preparation techniques based on solid- and vapour-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 1, p. 277-300, jan. 2011. ISSN 1618-2642.

- 36 VAS, G.; VEKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 233-254, mar. 2004. ISSN 1076-5174.
- 37 CURYLO, J.; WARDENCKI, W.; NAMIESNIK, J. Green aspects of sample preparation - a need for solvent reduction. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 1, p. 5-16, 2007. ISSN 1230-1485.
- 38 ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, abril 2010. ISSN 0021-9673.
- 39 BLOMBERG, L. G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: Microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 3, p. 797-807, fev. 2009. ISSN 1618-2642.
- 40 ALTUN, Z. *et al.* Drug screening using microextraction in a packed syringe (MEPS)/mass spectrometry utilizing monolithic-, polymer-, and silica-based sorbents. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 6, p. 829-840, 2006. ISSN 1082-6076.
- 41 MAGIERA, S. *et al.* Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 1-9, ago. 2013. ISSN 0021-9673.
- 42 VICKOVA, H. *et al.* 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, n. 2, p. 301-308, maio 2011. ISSN 0731-7085.
- 43 ABDEL-REHIM, M. *et al.* Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 35-39, maio 2005. ISSN 0003-2670.
- 44 ABDEL-REHIM, M. *et al.* Microextraction in packed syringe (MEPS) utilizing methylcyanopropyl-silarylene as coating polymer for extraction of drugs in biological samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 17, p. 2537-2544, 2006. ISSN 1082-6076.
- 45 FONSECA, B. M. *et al.* Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 3953-3963, maio 2013. ISSN 1618-2642.

- 46 RODRIGUES, M. *et al.* First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 913, p. 90-97, jan. 2013. ISSN 1570-0232.
- 47 RANI, S.; MALIK, A. K. A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 21, p. 2970-2977, nov. 2012. ISSN 1615-9306.
- 48 MANDRIOLI, R. *et al.* Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 2, p. 167-173, jan. 2011. ISSN 1570-0232.
- 49 SOMAINI, L. *et al.* Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 280-287, set. 2011. ISSN 0003-2670.
- 50 CHAVES, A. R. *et al.* Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 23, p. 2123-2129, ago. 2010. ISSN 1570-0232.
- 51 SARACINO, M. A.; TALLARICO, K.; RAGGI, M. A. liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 222-228, fev. 2010. ISSN 0003-2670.
- 52 MORALES-CID, G. *et al.* Direct automatic determination of free and total anesthetic drugs in human plasma by use of a dual (microdialysis-microextraction by packed sorbent) sample treatment coupled at-line to NACE-MS. **Electrophoresis**, v. 30, n. 10, p. 1684-1691, maio 2009. ISSN 0173-0835.
- 53 SAID, R. *et al.* Rapid and sensitive method for determination of cyclophosphamide in patients plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 5, p. 683-694, 2008. ISSN 1082-6076.
- 54 BAKARE-ODUNOLA, M. T. *et al.* The influence of lamivudine, stavudine and nevirapine on the pharmacokinetics of chlorpropamide in human subjects. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 33, n. 3, p. 165-171, jul.-set. 2008. ISSN 0378-7966.

- 55 CHUA, H. C. *et al.* Screening of chlorpropamide in horse plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, and confirmation by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 712, n. 1-2, p. 243-252, ago. 1998. ISSN 0378-4347.
- 56 SENGUPTA, P. *et al.* LC-MS-MS development and validation for simultaneous quantitation of metformin, glimepiride and pioglitazone in human plasma and its application to a bioequivalence study. **Chromatographia**, v. 69, n. 11-12, p. 1243-1250, jun. 2009. ISSN 0009-5893.
- 57 SALEM, II; IDREES, J.; AL TAMIMI, J. I. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 799, n. 1, p. 103-109, jan. 2004. ISSN 1570-0232.
- 58 MENDES, G. D. *et al.* A bioequivalence study of gliclazide based on quantification by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 3, p. 175-185, mar. 2007. ISSN 0946-1965.
- 59 NOH, K. *et al.* Simultaneous determination of glimepiride and its metabolites in human plasma by liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 12, p. 2073-2078, dez. 2011. ISSN 0253-6269.
- 60 FOROUTAN, S. M. *et al.* Application of monolithic column in quantification of gliclazide in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 4, p. 513-516, out. 2006. ISSN 0731-7085.
- 61 KUO, C. Y.; WU, S. M. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for analysis of gliclazide in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, n. 1-2, p. 131-135, set. 2005. ISSN 0021-9673.
- 62 EL-ENANY, N. M. *et al.* Development and validation of a rephased phase-HPLC method for simultaneous determination of rosiglitazone and glimepiride in combined dosage forms and human plasma. **Chemistry Central Journal**, v. 6, jan. 2012. ISSN 1752-153X.
- 63 SONG, Y. K. *et al.* Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore high performance liquid chromatography with column-switching. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 810, n. 1, p. 143-149, out. 2004. ISSN 1570-0232.
- 64 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, mar. 2011. ISSN 1735-207X.
- 65 KUNDLIK, M. L.; ZAWARE, B. H.; KUCHEKAR, S. R. Rapid and specific approach for direct measurement of glimepiride in human plasma by lc-esi-ms-ms employing automated 96 well format: application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 1, p. 64-70, jan. 2012. ISSN 0021-9665.
- 66 DANLAMI, U. *et al.* The effect of chloroquine on the pharmacokinetics of chlorpropamide in human volunteers. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1682-1686, out. 2011. ISSN 1996-0816.
- 67 FENG, C. H.; YANG, C. M.; LU, C. Y. Trace analysis of glyclazide in human plasma at microscale level by mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3411-3417, out. 2009. ISSN 1615-9306.
- 68 HU, X. *et al.* Simultaneous quantification of benazepril, gliclazide and valsartan in human plasma by LC-MS/MS and application for rapidly measuring protein binding interaction between Rhein and these three drugs. **Chromatographia**, v. 69, n. 9-10, p. 843-852, maio 2009. ISSN 0009-5893.
- 69 LING, G. X. *et al.* Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric method for determination of gliclazide in human plasma. **Analytical Letters**, v. 39, n. 7, p. 1381-1391, 2006. ISSN 0003-2719.
- 70 VENKATESH, P. *et al.* 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, n. 10, p. 1043-1048, out. 2006. ISSN 0269-3879.
- 71 ZHONG, G. P. *et al.* 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, n. 11, p. 1462-1471, nov. 2005. ISSN 1076-5174.
- 72 PARK, J. Y. *et al.* Quantification of gliclazide by semi-micro high-performance liquid chromatography: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy subjects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 943-949, jun. 2004. ISSN 0731-7085.
- 73 NAJIB, N. *et al.* Bioequivalence evaluation of two brands of gliclazide 80 mg tablets (glyzide (R) & diamicon (R)) - in healthy human volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 23, n. 5, p. 197-202, jul. 2002. ISSN 0142-2782.

- 74 POIRIER, J. M.; PEREZ, M.; CHEYMOL, G. High-performance liquid-chromatographic determination of gliclazide in human-plasma. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v. 421, n. 1, p. 223-226, out. 1987. ISSN 0378-4347.
- 75 LAKSHMI, K. S., RAJESH, T. Separation and quantification of eight antidiabetic drugs on a high-performance liquid chromatography: its application to human plasma assay. **International Scholarly Research Network - ISRN Pharmaceuticals**, 2011 .
- 76 CHAKRADHAR, L. *et al.* 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, n. 1, p. 58-63, jan. 2008. ISSN 0269-3879.
- 77 YUEZUEAK, N.; OEZDEN, T.; OEZILHAN, S. Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 66, p. S165-S168, 2007. ISSN 0009-5893.
- 78 DOTSIKAS, Y. *et al.* 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, n. 14, p. 2055-2061, 2005. ISSN 0951-4198.
- 79 KIM, H. Y. *et al.* 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, jan. 2004. ISSN 0253-2964.
- 80 KIM, H. *et al.* Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS and comparison of sample preparation methods for glimepiride. **Chromatographia**, v. 60, n. 1-2, p. 93-98, Jul 2004. ISSN 0009-5893.
- 81 ABRAHIM, A. *et al.* Practical comparison of 2.7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical process development. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 1, p. 131-137, jan.2010. ISSN 0731-7085.
- 82 SALISBURY, J. J. Fused-core particles: a practical alternative to sub-2 micron particles. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 10, p. 883-886, nov.-dez. 2008. ISSN 0021-9665.
- 83 ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Evaluation of microextraction by packed sorbent and micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a green approach in bioanalysis. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 10, p. 1225-1233, out. 2013. ISSN 0269-3879.

- 84 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, v. 2. p. 999 -1001. Brasília, 2010.
- 85 TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, mar.-abril 2006. ISSN 0100-4042.
- 86 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 27 de maio de 2012**. Brasília, 2012. ISSN 1677-7042.
- 87 SANTOS-NETO, A. J. Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 65-87, 2011. ISSN 1984-4433.
- 88 LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media chromatographic columns protein-immobilized and their evaluation for the analysis of drugs by direct injection of human plasma. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, jan.-fev. 2006. ISSN 0100-4042.

APÊNDICE A – Artigo submetido à revista Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Simultaneous determination of oral antidiabetic drugs in human plasma using microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography

Iara Maíra de Oliveira Viana, Paula de Paula Rosa Lima, Cristina Duarte
Vianna Soares, Christian Fernandes*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-
901, Belo Horizonte, MG, Brazil

*Corresponding author: Prof. Dr. Christian Fernandes

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha

31270-901– Belo Horizonte, MG, Brasil

E-mail: cfernandes@farmacia.ufmg.br

Phone: +55-31-34096957

Fax: +55-31-34096976

APÊNDICE B – Artigo submetido à revista Materials Science and Engineering C (trabalho em colaboração).

Magnetic solid-phase extraction based on mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles for analysis of oral antidiabetic drugs in human plasma

Karynne Cristina de Souza¹, Gracielle Ferreira Andrade¹, Ingrid Vasconcelos², Iara Maíra de Oliveira Viana², Christian Fernandes², Edésia Martins Barros de Sousa^{1*}

¹ Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN/CNEN. Rua Professor Mário Werneck, s/n. Campus Universitário – Belo Horizonte – MG, CEP 30.123-970 - Brasil.

² Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia– UFMG – Belo Horizonte, MG – Brasil.

* E-mail: sousaem@cdtn.br

Abstract: In the present work, magnetic nanoparticles embedded into mesoporous silica were prepared in two steps: first, magnetite was synthesized by oxidation-precipitation method, and next, the magnetic nanoparticles were coated with mesoporous silica by using nonionic block copolymer surfactants as structure-directing agents. The mesoporous SiO₂-coated Fe₃O₄ samples were functionalized using octadecyltrimethoxysilane as silanizing agent. The pure and functionalized silica nanoparticles were physicochemically and morphologically characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), N₂ adsorption, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The resultant magnetic silica nanoparticles were applied as sorbents for magnetic solid-phase extraction (MSPE) of oral antidiabetic drugs in human plasma. Our results revealed that the magnetite nanoparticles were completely coated by well-ordered mesoporous silica with free pores and stable pore walls, and that the structural and magnetic properties of

APÊNDICE C – Resumo de pôster apresentado no Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XIV).

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO EM SORBENTE EMPACOTADO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Iara Maíra de Oliveira Viana; Paula de Paula Rosa Lima; Ingrid Vasconcelos; Laura Maria Fontes Prado; Cristina Duarte Vianna Soares; Christian Fernandes

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Pres. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, MG, 31270-901.

A determinação de fármacos em plasma é fundamental em estudos de farmacocinética, de bioequivalência e na monitorização terapêutica. A etapa inicial da análise, denominada preparo de amostra, é a mais demorada e a que leva ao maior número de erros. Nesse contexto, recentemente foi desenvolvida a técnica de microextração em sorbente empacotado (MEPS), que é uma técnica simples, moderna e rápida. No presente estudo, foi desenvolvido método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando MEPS na etapa de preparo de amostras, para determinação dos fármacos clorpropamida, glibenclamida, gliclazida e glimepirida em água. Para estas análises foi utilizado cromatógrafo Agilent 1100 e as condições de análise foram: coluna Ace C8 150 x 4,6 mm, 5 µm; fase móvel constituída de acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 (55:45), na vazão de 1,5 mL/min; comprimento de onda de 230 nm; temperatura de 30 °C e volume de injeção de 20 µL. O dispositivo MEPS empregado possui seringa de 250 µL e 4 mg de sorbente C18. Inicialmente, preparou-se solução padrão contendo 5 µg/mL de cada fármaco. Pipetaram-se 20 µL dessa solução, que foram adicionados a 380 µL de água. Acrescentaram-se 100 µL de solução tampão fosfato pH 3,0 e agitou-se a mistura. Posteriormente, realizaram-se 15 ciclos de aspiração-ejeção da solução preparada através do dispositivo MEPS (100 µL por ciclo a 5 µL/s). O sorbente foi lavado duas vezes com 100 µL de água e, em seguida, duas vezes com 100 µL da mistura água:acetonitrila (95:5 v/v). A desorção dos analitos foi realizada com duas porções de 50 µL de acetonitrila. Antes de injetar, diluiu-se a solução com 100 µL de água. Os picos cromatográficos apresentaram adequada resolução (valores em torno de 2,5). Recuperação de 51,8%, 78,4%, 79,9% e 91,6% foram obtidos para clorpropamida, gliclazida, glimepirida e glibenclamida, respectivamente. Como esperado, os compostos mais apolares apresentaram valores de recuperação maiores. Conclui-se que a técnica MEPS é eficiente na extração dos fármacos antidiabéticos orais testados, entretanto mais experimentos são necessários para otimização do método.

Agradecimentos

À FAPEMIG, CAPES e PRPq/UFMG pelo apoio financeiro.

APÊNDICE D – Resumo expandido de pôster apresentado no 15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Ex Tech 2013).

ExTech® 2013
15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies

Microextraction by packed sorbent for analysis of oral antidiabetic drugs in human plasma

Iara Máira de O. Viana^{*}; Paula de P. R. Lima; Cristina D. V. Soares; Christian Fernandes

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 - Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil
^{*}iaramaira@gmail.com

Keywords: microextraction by packed sorbent, oral antidiabetic drugs, human plasma, experimental design

1. INTRODUCTION

The analysis of drugs in plasma and blood is essential during drug discovery and development. Furthermore, it is necessary in clinical and forensic toxicology. However, the extraction of drugs from complex biological matrices, such as plasma and urine, is still a challenge [1]. Sample preparation methods are usually solvent and time-consuming and are responsible for at least one-third of the error generated during the performance of an analytical method [2]. Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a new technique that can reduce the volume of solvent and sample needed, is easy to use and is rapid [3].

The aim of this study was to develop and optimize a method using microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography with fused core column and ultraviolet detection to analyze chlorpropamide, gliclazide, glibenclamide (also known as glyburide) and glimepiride in human plasma.

2. EXPERIMENTAL

Chromatographic method was developed and optimized using an Agilent 1200 liquid chromatography and a Kinetex fused core column (100 mm x 4.6 mm, 2.6 µm) at 30 °C, acetonitrile: potassium phosphate solution 10 mM pH 3.0 (50:50) at a flow-rate of 1.5 mL/min as mobile phase. The injection volume was 5 µL and detection was at 230 nm.

A chemometric approach was employed for optimization of MEPS parameters. The MEPS extraction and desorption conditions were optimized separately. Firstly, fractional factorial design (FFD) 2⁴⁻¹ was used for optimizing the variables which could affect the extraction step. Four variables were studied and are presented in Table 1. The FFD involved eight experiments without replication and three experiments at the central point, carried out randomly.

Afterwards, desorption variables were optimized using a complete factorial design (CFD).
36th Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

The evaluated factors and respective levels are presented in Table 2. The CFD was performed randomly and with one replication of each experiment.

Table 1. Evaluated variables on the extraction step and their respective levels in the FFD 2⁴⁻¹.

Variables of extraction step	Evaluated levels		
	-1	0	1
(A) Sample volume (µL)	100	250	400
(B) Sample dilution	1:1	1:2	1:3
(C) pH of buffer used at sample dilution	2.5	6.0	9.5
(D) Number of aspiration/ejection cycles through the device	5	10	15

Table 2. Evaluated variables on the desorption step and their respective levels in the CFD 2².

Variables of desorption step	Evaluated levels	
	-1	1
(A) Percentage of acetonitrile in the elution solvent	50	100
(B) Number of aspirations of elution solvent through the device	2	4

All experiments were performed using the MEPS syringe (250 µL syringe, C18 sorbent, 4 mg). Before being used for the first time, the sorbent was manually conditioned with 250 µL methanol followed by 250 µL water. After that, the spiked plasma sample (containing 4 µg/mL of each oral antidiabetic drug) was diluted. Then, 100 µL of this sample was manually drawn through the sorbent and ejected in the same vial. The solid phase was washed four times with 100 µL of water at each time to remove interferences. The analyte was then desorbed with 50 µL of eluent.

After experimental design, software Statistica 7.0 was used to evaluate the results and build the models.

/continua

APÊNDICE D (Continuação e conclusão)

ExTech® 2013

15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies

3. RESULTS AND DISCUSSION

FFD and CFD plans and the obtained results expressed as recovery for oral antidiabetic drugs in human plasma samples are presented in Table 3 and Table 4, respectively.

Table 3. FFD 2⁴-1 plan and corresponding recovery for oral antidiabetic drugs in human plasma.

Exp. no.	Variables				Recovery value			
	A	B	C	D	1	2	3	4
1	-1	-1	-1	-1	83	96	88	95
2	1	-1	-1	1	42	73	74	81
3	-1	1	-1	1	95	108	114	115
4	1	1	-1	-1	19	26	27	28
5	-1	-1	1	1	8	30	40	15
6	1	-1	1	-1	0	6	4	2
7	-1	1	1	-1	1	15	5	4
8	1	1	1	1	1	6	4	2
9	0	0	0	0	1	38	20	29
10	0	0	0	0	1	38	15	24
11	0	0	0	0	1	39	18	29

Exp. no. = experimental number, A = sample volume, B = sample dilution, C = pH value of buffer used at sample dilution, D = number of aspiration/ejection cycles, 1 = clorpropamide, 2 = gliclazide, 3 = glibenclamide, 4 = glimepiride.

Table 4. CFD 2² plan and corresponding recovery for oral antidiabetic drugs in human plasma.

Exp. no.	Rep. no.	Variables		Recovery values			
		A	B	1	2	3	4
1	1	-1	-1	58	78	82	81
2	1	1	-1	75	92	98	102
3	1	-1	1	71	92	95	100
4	1	1	1	104	106	125	126
5	2	-1	-1	68	88	86	87
6	2	1	-1	72	88	96	99
7	2	-1	1	74	93	96	100
8	2	1	1	106	105	124	120

Exp. no. = experimental number, Rep. = replicate number, A = amount of acetonitrile in elution solvents, B = number of aspirations of elution solvent through the device, 1 = clorpropamide, 2 = gliclazide, 3 = glibenclamide, 4 = glimepiride.

All variables of the extraction step were statistically significant (with confidence limit of 95%), but the pH value and sample volume were by far the most important parameters (as observed in the Pareto chart – not showed here). The results demonstrated that there is a tendency of higher recovery when sample volume was 100 µL, sample dilution was 1:1, pH was 2.5 and number of aspiration/ejection cycles was 15. So, these levels were fixed, except dilution and number of cycles. Sample dilution was changed to 1:2 because 1:1 level generated a high pressure in the MEPS system, which can reduce the device life cycle.

Intending to simplify the extraction process 10 cycles of aspiration/ejection was chosen instead of 15 cycles.

The experimental design for the desorption step showed better recoveries at higher percentage of acetonitrile in elution solvent and higher number of aspirations of elution solvent through the device. However, according to the surface plot (not showed here) with 70% of acetonitrile and 3 cycles of aspiration/ejection of 50 µL a high recovery is also expected. Thus, these conditions were chosen for further tests. Figure 1 shows a representative chromatogram in the optimized conditions.

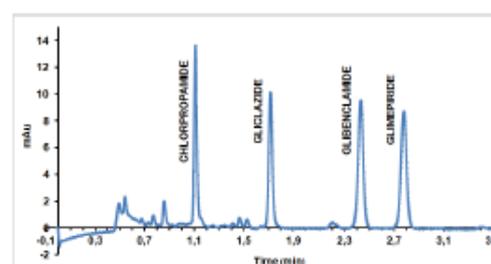


Figure 1. Chromatogram obtained with optimized method.

4. CONCLUSION

The experimental design helped to understand the behavior of MEPS method on the extraction of clorpropamide, gliclazide, glibenclamide and glimepiride in human plasma samples. High recovery and adequate detectability was achieved. Furthermore, the use of fused core column allowed the separation of the four tested drugs in less than 3.5 minutes.

1. M. ABDEL-REHIM, LC-GC Europe 22 (2009) 8-19.
2. R. E. MAJORS, LC-GC 9 (1991) 16-20.
3. M. ABDEL-REHIM, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2569-2580.

APÊNDICE E – Trabalhos em colaboração apresentados no COLACRO XIV e no Ex Tech 2013.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA

Paula Rocha Chellini (PG)¹; Iara Maira de Oliveira Viana (PG)^{1,2}; Eduardo Burgarelli Lages (IC)¹; Gerson Antônio Pianetti (PQ)¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

²Especialização em Vigilância Sanitária, IFAR/PUC-GO.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a tuberculose acompanha a humanidade por milhares de anos e tem sido um dos maiores problemas na área de saúde. Estima-se que em 2010 houveram 8,8 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, com 1,1 milhões de mortes entre pacientes HIV-negativos e 0,35 milhões de mortes entre pacientes HIV-positivos. No Brasil, em 2008, foram notificados 68.147 casos novos de tuberculose (coeficiente de incidência de 35,59 por 100.000 habitantes). Para uma cura sem recidiva, é necessário um tratamento utilizando vários fármacos combinados. O esquema básico para adultos e adolescentes preconizado pelo Ministério da Saúde consiste em dois meses de tratamento com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e cloridrato de etambutol, seguidos de quatro meses de tratamento com rifampicina e isoniazida. O uso de dose fixa combinada simplifica o tratamento, minimizando erros e aumentando a aceitação do paciente. Não foram encontrados métodos farmacopeicos para doseamento simultâneo de rifampicina e isoniazida em comprimidos de dose fixa combinada. Dessa forma, foi desenvolvido um método cromatográfico para quantificação simultânea dos ativos em comprimidos. As análises foram realizadas em cromatógrafo Agilent® 1200 provido de detector ultravioleta (DAD) a 238 nm e coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A eluição foi feita em gradiente, sendo que na primeira etapa utilizou-se tampão fosfato de sódio dibásico 10 mM com trietilamina 0,1% e acetonitrila na proporção de 95:5 (v/v), e na segunda fase do gradiente utilizou-se a proporção de 1:1 (v/v). O fluxo foi de 1,2 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. Para a otimização do método foram avaliados os parâmetros fator de retenção (K), resolução entre os picos (R_s) e fator de cauda (T). O método foi validado em relação à linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez, conforme procedimentos recomendados pela Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA. A linearidade do método foi confirmada para rifampicina e para isoniazida na faixa de 80 a 120%, resultando em coeficiente de correlação superiores a 0,99. Além disso, os valores obtidos com os testes de precisão e exatidão foram satisfatórios.

Agradecimentos:

À CAPES pela bolsa a Viana, I.M.O. e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

/continua

APÊNDICE E (Continuação)**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FORMALDEÍDO EM COSMÉTICOS**

Daniella Guimarães da Silva (daniellaguimaraes@yahoo.com.br)

Iara Máira de Oliveira Viana (iaramaira@gmail.com)

Paula Lana de Miranda Drummond (paulalana.86@gmail.com)

Délio Andrade Ferreira (delio.ferreira@gmail.com)

Thayse Rosane Araújo de Oliveira (thavserao@hotmail.com)

Amália Soares Santana (cosmeticos@funed.mg.gov.br)

Segundo a RDC 36, de 2009, a comercialização de formaldeído é proibida em estabelecimentos como drogarias, farmácias, supermercados, empórios, lojas de conveniências e drugstores e seu uso como alisante capilar não é permitido pela ANVISA. A legislação sanitária permite o uso de formaldeído apenas na função de conservantes em produtos cosméticos capilares (com limite máximo de 0,2%). Entretanto, o formaldeído continua sendo amplamente utilizado em salões de beleza com a finalidade de alisamento. Com o intuito de verificar o cumprimento das legislações vigentes pelos fabricantes de cosméticos e demais estabelecimentos, foi desenvolvido, no LACEN-MG e com apoio da ANVISA, método analítico de determinação de formaldeído. O método analítico desenvolvido baseia-se na quantificação da dinitrofenilhidrazona através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e detecção no ultravioleta. A dinitrofenilhidrazona é o produto da reação do formaldeído com a 2,4-dinitrofenilhidrazina em meio ácido. A 2,4-dinitrofenilhidrazina é adicionada em excesso, portanto a quantidade de dinitrofenilhidrazona formada é proporcional a de formaldeído. O método analítico foi validado de acordo com a RE 899, de 2003. Utilizaram-se cromatógrafo Shimadzu, colunas C18 150 x 4,6 mm, 5 µm; fase móvel metanol:água (70:30), na vazão de 1,5 mL/min; comprimento de onda de 360 nm; temperatura de 25°C e volume de injeção de 20 µL. A seletividade do método foi testada através da análise de soluções branco e padrão, estudo da pureza do pico e pela comparação de coeficiente angular entre as matrizes shampoo e finalizador. A linearidade do método foi confirmada na faixa de concentração de 3,0 a 7,0 ppm de formaldeído, resultando em valores de coeficiente de correlação superiores a 0,99 e valores *p* da inclinação significativos a 5% de probabilidade. A equação da reta obtida no teste linearidade foi $y = 368302,01x - 151409,01$. A precisão do método foi confirmada pela repetitividade (DPR=1,32) e precisão intermediária (DPR=1,73%). A recuperação foi superior a 80% e inferior a 110%, portanto o método é exato. O limite de detecção foi de 0,0116 ppm, enquanto o limite de quantificação foi de 0,1 ppm. Verificou-se ainda que o método é robusto e que as soluções amostra preparadas são estáveis por 12 horas.

Agradecimentos:

À FUNED, à ANVISA e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

APÊNDICE E (Continuação)

ExTech® 2013
15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies

Magnetic solid phase extraction and high performance liquid chromatography for analysis of oral antidiabetic drugs in human plasma

Ingrid Vasconcelos^{1*}, Iara M. de O. Viana¹, Gracielle Ferreira Andrade², Edesia M. B. de Souza², Christian Fernandes¹

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, ²Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Universidade Federal de Minas Gerais – Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627- Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil. *ingvasco@gmail.com

Keywords: magnetic solid phase extraction, sample preparation, oral antidiabetic drugs, human plasma

1. INTRODUCTION

The analysis of drugs in biological fluids consists of a number of unit operations and has several applications in industry, research and clinical context. It is useful in therapeutic monitoring, in pharmacokinetic studies in order to evaluate the bioavailability of novel dosage forms and in bioequivalence tests for development of generic and similar drugs [1].

There are several techniques described in the literature for extraction of drugs in biological matrices such as plasma. Protein precipitation and liquid-liquid extraction are the most common. These techniques are tedious, expose the analyst to toxic solvents and generate large amounts of waste, which are harmful to the environment [2].

Magnetic solid phase extraction (MSPE) is a miniaturized and modern technique that demands small volume of sample and solvents for extraction and desorption. It is a new mode of solid phase extraction based on the use of magnetic sorbents. This technique allows the concentration of analytes increasing the detectability of the method. Furthermore, the large contact surface provided by the sorbent dispersion in the matrix produces a high recovery of the analytes [3].

The purpose of this study is to develop a method for the determination of oral antidiabetic drugs (chlorpropamide, gliclazide, glibenclamide and glimepiride) in human plasma using magnetic solid phase extraction and high performance liquid chromatography.

2. EXPERIMENTAL

Chromatographic method was developed and optimized for simultaneous determination of four antidiabetic drugs. Analysis was carried out in an Agilent 1100 liquid chromatography using a C8 column (150 x 4.6 mm, 5 µm) at 30 °C, acetonitrile:potassium phosphate solution 10 mM pH

3.0 (55:45) at a flow-rate of 1.5 mL min⁻¹ as mobile phase. The detection was at 230 nm and the injection volume was 25 µL.

The sorbent material for MSPE used in this study consisted of a core of magnetite (Fe₃O₄) coated with mesoporous silica SBA-15 functionalized with octadecyl-trimethoxysilane (C18). The spherical particles size ranges between 0.139 and 0.476 µm.

Before the extraction, the magnetic material was activated by stirring with methanol for 1 minute and, subsequently, with water for 1 minute. Secondly, the samples to be analyzed were mixed with the magnetic material and agitated for 5 minutes, when occurred the sorption of the analytes. The separation was made using a magnet and it was followed by discarding the liquid phase, which contained the interfering compounds. The analytes were desorbed with organic solvent by shaking for 5 minutes and the magnetic material was separated with the magnet. The organic phase obtained at the end of the extraction was mixed with water at a 1:1 ratio and was analyzed by liquid chromatography. A standard solution with the same concentration of sample to be extracted was injected for recovery determination.

Initial tests were performed in 2 mL water sample containing 10 µg mL⁻¹ of the four antidiabetics and adjusting the pH with 1 mL of phosphate solution pH 3.0. The extraction procedure was performed using 5 mg of sorbent material with stirring for 5 minutes. 500 µL of the liquid phase was taken and added to 500 µL of water. The organic phase obtained at the end by elution with 500 µL of acetonitrile was also added with 500 µL of water. These samples were analyzed under the conditions already mentioned.

The test with biological matrix was performed with 2 mL of spiked human plasma sample with antidiabetics at 10 µg mL⁻¹ and the pH was adjusted with 1 mL of phosphate solution pH 3.0. The same extraction procedure for water samples was made, but only the final organic phase

APÊNDICE E (Conclusão)

ExTech® 2013

15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies

was collected for analysis by chromatography. The same procedures were performed in blank plasma sample without antidiabetics in order to evaluate selectivity.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The recovery percentage for the tests performed in water samples are shown in Table 1. These values showed a particularly high recovery for nonpolar drugs such as glibenclamide and glimepiride, which were almost completely extracted. These drugs have higher affinity for the C18 phase of the sorbent material than chlorpropamide and gliclazide, which probably was responsible for this behavior.

Table 1. Recovery percentage (%) of antidiabetics in liquid and organic phases in water samples extraction.

Antidiabetic	Liquid phase Recovery (%)	Organic phase recovery (%)
Chlorpropamide	17	33
Gliclazide	4	43
Glibenclamide	0	70
Glimepiride	0	67

The recovery observed on the tests performed on plasma spiked with antidiabetics is shown in Table 2. It was also possible to note a better recovery for drugs with more nonpolar properties. However, there was a lower recovery for all drugs compared to the values obtained for water sample. This is due to the greater complexity of the matrix and the presence of possible interferences, which showed that the method for application in biological matrices needs to be optimized.

Table 2. Recovery percentage (%) of antidiabetics in organic phase of spiked plasma sample extraction.

Antidiabetic	Organic phase recovery (%)
Chlorpropamide	4
Gliclazide	3
Glibenclamide	19
Glimepiride	47

Figure 1 shows the chromatogram obtained for standard solution, spiked plasma samples and blank organic phases after extraction.

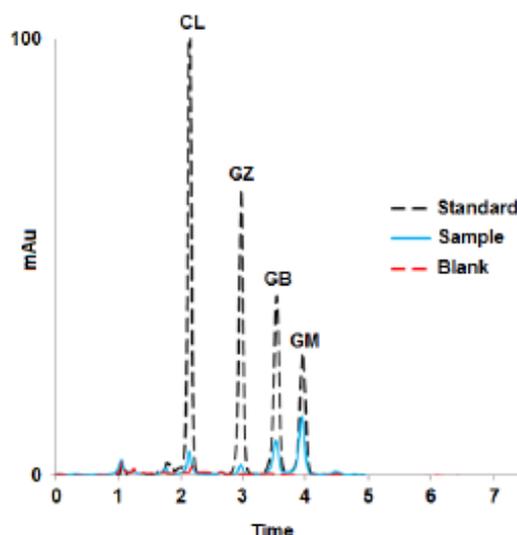


Figure 1. Chromatogram of chlorpropamide (CL), gliclazide (GZ), glibenclamide (GB) and glimepiride (GM) in standard solution, spiked plasma and blank samples in organic phase after extraction.

4. CONCLUSION

The chromatographic method developed in this study was able to separate the analytes with appropriate resolution and efficiency. The sorbent material was capable of extracting the antidiabetic drugs from human plasma, being useful for the sample preparation from biological matrices. However, it is still necessary to optimize the method in order to increase the recovery percentage. The optimized method will be validated and applied to real plasma samples.

1. C. Fernandes, A. J. Santos Neto, J. C. Rodrigues, C. Alves, F. M. Lanças. *J. Chromatogr. B*. 847 (2007) 217–223.
2. A. J. Santos Neto, J. C. Rodrigues, C. Fernandes, G. M. Titato, C. Alves, F. M. Lanças. *J. Chromatogr. A*. 1105 (2006) 71–76.
3. Q. Gao, D. Luo, J. Ding, Y. Q. Feng. *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 5602–5609.