UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

BRUNA JULIANA MOREIRA

Desenvolvimento e validação de técnicas de microextração para análise do fluconazol em fluidos biológicos

Ribeirão Preto
2018

BRUNA JULIANA MOREIRA

Desenvolvimento e validação de técnicas de microextração para análise do fluconazol em fluidos biológicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 24/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moreira, Bruna Juliana

Desenvolvimento e validação de técnicas de microextração para análise do fluconazol em fluidos biológicos. Ribeirão Preto, 2018.

134 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Fluconazol. 2. Microextração líquido-líquido dispersiva. 3. Microextração em fase líquida com fibra oca mediada por carreador. 4. Líquor. 5. Plasma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Juliana Moreira
Desenvolvimento e validação de técnicas de microextração para análise do fluconazol em fluidos biológicos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho.

A meu noivo Samuel, por todo amor, companheirismo e compreensão.

A minha família, principalmente meus pais Antonio e Solange, minhas avós Orlanda e Viturina e meu irmão Murilo, por serem fonte de amor e apoio.

A minha orientadora, Profa.Cristiane, por ser exemplo de comprometimento e dedicação.

A profa. Angelita Maria Stabile, pela amizade e por me proporcionar a experiência de realizar o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino sob sua supervisão.

A Letícia Schiave, por me auxiliar nas dúvidas e na coleta das amostras do paciente.

Ao prof. Roberto Martinez, que aceitou fazer parte de nossa equipe científica e tornou possível a obtenção das amostras biológicas.

Aos professores Luis Alexandre Pedro de Freitas, Fabíola Manhas Verbi Pereira e Delia Rita Tapia Blácido, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores Alessandra Vincenzi Jager, Flavio da Silva Emery, Luis Gustavo Dias e Zeki Naal, por solucionarem minhas dúvidas em química.

Ao professor Alberto Federman Neto, meu primeiro orientador na área científica, que me auxiliou neste doutorado fornecendo reagente essencial para uma das etapas realizadas.

Aos técnicos de laboratório José Orestes, Mariana e Maíra, pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao Daniel Blascke Carrão, pela disposição em ensinar a técnica de HF-LPME.

Ao professor Sérgio Emanuel Galembeck e ao pós graduando Renato Pereira Orenha, por terem me fornecido a oportunidade de aprender um pouco sobre a área de cálculos computacionais em química.

Aos meus amigos de trabalho na EERP, pela convivência diária e pelo ambiente de crescimento profissional.

Aos amigos de longa data, que mesmo distantes, tornaram mais leve a caminhada.

Aos professores Jonas Augusto Rizzato Paschoal e Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira e ao pós doutorando Daniel Valente Neves, pelas contribuições realizadas no exame de qualificação.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pela orientação e por toda a ajuda recebida.

A FCFRP, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a finalização desta etapa.

RESUMO

MOREIRA, B. J. **Desenvolvimento e validação de técnicas de microextração para análise do fluconazol em fluidos biológicos.** 2018. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O fluconazol (FLU) é um antifúngico de amplo espectro de ação desenvolvido na década de 80. Sua análise em amostras biológicas já foi descrita utilizando várias técnicas de preparo como a extração líquido-líquido, em fase sólida, a ultrafiltração e a precipitação de proteínas. No entanto, estas extrações requerem trabalho laboratorial intenso e, muitas vezes, o uso de grandes volumes de solventes orgânicos. Assim, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de métodos para a quantificação do fluconazol em amostras de líquor utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e em amostras de plasma utilizando a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME). Para a definição das condições de extração do FLU foram utilizados delineamentos fatoriais fracionados e delineamentos compostos centrais. A condição estabelecida para extração por DLLME utilizou apenas 200 µL de líquor e clorofórmio e isopropanol como solvente extrator e dispersor, respectivamente. Para a HF-LPME a condição de extração selecionada fez uso de 500 µL de plasma, sendo a precipitação de proteínas realizada com Na_2SO_4. A fibra de polipropileno de 13 cm foi impregnada com solução de octanol:Adogen® 464 (90:10, v/v), a fase aceptora foi composta por NaCl 1 $mol.L^{-1}$ e várias amostras foram extraídas simultaneamente. Para a análise nos dois métodos foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, sendo a fase móvel composta por etanol e água. A validação dos métodos procedeu-se de acordo com os guias da ANVISA e EMA e foi obtida faixa linear de análise de 0,25 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, recuperação de 70 % para o FLU e de 81 % para a fenacetina por DLLME e o intervalo linear de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, com recuperação de 12 % para o FLU por HF-LPME mediada por carreador. Os valores de precisão e exatidão permaneceram dentro dos limites recomendados, as amostras mantiveram-se estáveis e os métodos foram seletivos e não apresentaram efeito residual, sendo aplicados para determinação da concentração do FLU em amostras de um paciente em tratamento para neuromicose utilizando o fármaco estudado. Portanto, os métodos desenvolvidos utilizaram baixos volumes de solventes e de amostra, apresentaram faixa linear ampla, que permite a análise de amostras de pacientes que fazem uso de diferentes esquemas terapêuticos e, até o momento, são os únicos métodos descritos que fizeram uso de técnicas de microextração para a análise do FLU em amostras biológicas.

Palavras-chave: Fluconazol. Microextração líquido-líquido dispersiva. Microextração em fase líquida com fibra oca mediada por carreador. Líquor. Plasma.

ABSTRACT

MOREIRA, B. J. **Development and validation of liquid microextraction techniques for fluconazole analysis in biological fluids.** 2018. 134 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fluconazole (FLU) is a broad-spectrum antifungal agent developed in the 80's, which analysis in biological samples has already been described using several sample preparation techniques such as liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, ultrafiltration and protein precipitation. These extractions require intensive work and sometimes the use of large amounts of organic solvents, thus, the aim of this study was the development of two methods for FLU quantification in cerebrospinal fluid (CSF) samples by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and in plasma by using hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME). For extraction optimization, fractional factorial designs and central composite designs were employed. The condition established for DLLME used 200 μL of CSF and chloroform and isopropyl alcohol as extraction and disperser solvents. For HF-LPME method the extraction was performed with 500 μL of plasma and protein precipitation with Na_2SO_4. Also, a 13 cm polypropylene fiber impregnated with octanol: Adogen® 464 (90:10, v/v) and an acceptor phase consisting of NaCl 1 mol L^{-1} were used and several samples were extracted simultaneously. Quantification for both methods was performed using high performance liquid chromatography with diode array detector and the mobile phase was composed of ethanol and water. The validation was performed according to ANVISA and EMA guidelines and for DLLME method a recovery of 70% for FLU and 81% for phenacetin and a linear range from 0.25 to 62.5 $\mu g.mL^{-1}$ were obtained. For carrier mediated HF-LPME method a range from 1.0 to 62.5 $\mu g.mL^{-1}$ and a recovery of 12% for FLU were achieved. The precision and accuracy values were within the recommended limits, samples kept stable and the developed methods were selective, had no residual effect and were applied to determine the FLU concentration in samples of a patient treated for neuromycosis. Therefore, the developed methods used low solvent and sample volumes and showed wide linear range, which allows the analysis of samples from patientes that make use of different therapeutic schemes and, so far, are the only ones described in literature that are based on microextraction techniques for FLU analysis in biological samples.

Keywords: Fluconazole. Dispersive liquid-liquid microextraction. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction. Cerebrospinal fluid. Plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos antifúngicos azólicos 3
Figura 2 - Mecanismo de ação dos triazóis 4
Figura 3 - Estrutura química do FLU e grupos relacionados a sua ionização 6
Figura 4 - Principais etapas de realização de experimentos para a otimização de uma resposta 13
Figura 5 - Procedimento da DLLME 20
Figura 6 - DLLME com solventes de baixa densidade 22
Figura 7 - Diagrama das etapas realizadas na DLLME 29
Figura 8 - Cromatogramas obtidos em estudos realizados com a coluna Lichrospher® RP 18 . 39
Figura 9 - Cromatogramas obtidos nos estudos utilizando aditivos e a coluna Lichrospher® RP 18 40
Figura 10 - Cromatograma referente às condições estabelecidas para análise do FLU e do IS. 41
Figura 11 - Área obtida para o FLU (A) e para o IS (B) durante a seleção dos solventes 42
Figura 12 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do FLU. A linha vertical define o nível de confiança de 95 % 44
Figura 13 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do IS. A linha vertical define o nível de confiança de 95 % 45
Figura 14 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre o volume de fase sedimentada. A linha vertical define o nível de confiança de 95 % 46
Figura 15 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis avaliadas no CCD sobre a área do FLU 48
Figura 16 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis avaliadas no CCD sobre a recuperação do FLU 48
Figura 17 - Gráfico de desejabilidade para a área do FLU 50
Figura 18 - Porcentagem de erro padrão relativo versus concentração de FLU para (A) modelo de regressão linear não ponderado e (B) modelo de regressão ponderado com peso 1/x 52
Figura 19 - Cromatogramas das amostras de branco de CSF e da amostra referente ao LSQ ... 55
Figura 20 - Cromatograma referente à análise de uma amostra de paciente em tratamento com o FLU 60
Figura 21 - Classificação da HF-LPME 67
Figura 22 - Representação da HF-LPME de três fases para extração de analitos básicos 69
Figura 23 - Avaliação do tipo de solvente de impregnação na fibra para a extração do FLU por HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH 85

Figura 24 - Avaliação da recuperação do FLU utilizando a HF-LPME de duas fases..... 86
Figura 25 - Mecanismo de extração do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador..... 87
Figura 26 - Avaliação da influência da lavagem prévia da fibra com acetona na recuperação do FLU 88
Figura 27 - Avaliação da influência da composição da fase aceptora na recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador 89
Figura 28 - Avaliação da influência da centrifugação na recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador..... 90
Figura 29 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador. A linha vertical define o nível de confiança de 95 % 92
Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis concentração de carreador iônico e pH da fase doadora sobre a recuperação do FLU 96
Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis tempo de extração e pH da fase doadora sobre a recuperação do FLU 97
Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis concentração de carreador iônico e tempo de extração sobre a recuperação do FLU..... 97
Figura 33 - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do FLU 99
Figura 34 - Porcentagem do erro padrão relativo versus concentração plasmática do FLU para (A) modelo de regressão linear não ponderado e (B) modelo de regressão ponderado com peso 1/x 101
Figura 35 - Cromatogramas referentes à análise de amostras de branco de plasma e de uma amostra de plasma fortificada (LSQ)..... 104
Figura 36 - Cromatograma referente à análise de uma amostra de plasma de paciente em tratamento com o FLU 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos descritos na literatura para quantificação de FLU em amostras biológicas 8
Tabela 2 - Condições avaliadas para a análise do FLU por HPLC com o uso da coluna Ascentis® Express C 18 27
Tabela 3 - Condições de extração por DLLME realizadas no FFD $2^{(7-3)}$ 30
Tabela 4 - Fatores e níveis para a construção da matriz do FFD $2^{(7-3)}$ 30
Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no CCD 31
Tabela 6 - Condições de extração por DLLME realizadas no CCD 31
Tabela 7 - Níveis de concentração utilizados para obtenção da curva analítica 33
Tabela 8 - Área e recuperação (R) obtidos para o FLU e IS e volume recuperado de solvente extrator para cada condição do FFD (n = 3) 43
Tabela 9 - Área e recuperação (R) obtidos para o FLU e IS e volume recuperado de solvente extrator para cada condição do CCD (n = 3) 47
Tabela 10 - Coeficientes do modelo de superfície de resposta para a DLLME 47
Tabela 11 - Condições estabelecidas para a análise do FLU em amostras de CSF 50
Tabela 12 - Parâmetros das curvas de calibração e soma dos EPRs para os pesos de ponderação avaliados (n = 30) 52
Tabela 13 - ANOVA para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado, com nível de significância $p = 0,05$ 53
Tabela 14 - LIQ do método para a análise do FLU em CSF 53
Tabela 15 - Precisão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em CSF ... 54
Tabela 16 - Exatidão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em CSF .. 55
Tabela 17 - Índice de pureza cromatográfica referente ao FLU e ao IS 56
Tabela 18 - Estabilidade do FLU em solução metanólica 57
Tabela 19 - Estabilidade do FLU em CSF após ciclos de congelamento e descongelamento ... 58
Tabela 20 - Estabilidade de curta duração do FLU em amostras de CSF 58
Tabela 21 - Estabilidade de longa duração para o FLU em amostras de CSF 59
Tabela 22 - Estabilidade do FLU pós-processamento 59
Tabela 23 - Fatores e níveis para a construção da matriz do FFD $2^{(8-4)}$ 76
Tabela 24 - Condições de extração por HF-LPME realizadas no FFD $2^{(8-4)}$ 77
Tabela 25 - Fatores e níveis utilizados no CCD para otimização da extração por HF-LPME ... 77
Tabela 26 - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME 78
Tabela 27 - Níveis de concentração plasmática para a obtenção da curva analítica para o FLU 79

Tabela 28 - Área e recuperação média (R) do FLU obtidas para as análises realizadas no FFD (n = 3)..... 91
Tabela 29 - Área e recuperação média (R) obtidas para o FLU para as análises realizadas no CCD (n = 3) 95
Tabela 30 - Coeficientes do modelo de superfície de resposta para a extração do FLU de amostras de plasma por HF-LPME mediada por carreador 96
Tabela 31 - Condições estabelecidas para a análise do FLU em amostras de plasma por HF-LPME 100
Tabela 32 - Parâmetros das curvas de calibração e somas dos EPRs para os pesos de ponderação avaliados (n = 30)..... 102
Tabela 33 - ANOVA para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado, com nível de significância p = 0,05 102
Tabela 34 - Precisão intracorrida e intercorridas do método para análise do FLU em plasma. 103
Tabela 35 - Exatidão intracorrida e intercorridas do método para análise do FLU em plasma 104
Tabela 36 - Estudos de estabilidade para o FLU em plasma e em solução de análise 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α_D - fração não ionizada do analito na fase doadora

α_A - fração não ionizada do analito na fase aceptora

a - coeficiente angular

ANOVA - análise de variância

b - coeficiente linear

BBD - delineamento de Box-Behnken

CA - controle de qualidade de alta concentração

CB - controle de qualidade de baixa concentração

CCD - delineamento composto central

CE - eletroforese capilar

$C_{eq\ fase\ aceptora}$ - concentração no estado de equilíbrio na fase aceptora

$C_{eq\ fase\ doadora}$ - concentração no estado de equilíbrio na fase doadora

CFD - delineamento fatorial completo

CM - controle de qualidade de média concentração

CMD - concentração média determinada

CSF - líquor

CV - coeficiente de variação

D - coeficiente de distribuição

D_{total} - desejabilidade total

d - desejabilidade individual

DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva

DLLME-SFO - microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação da gota suspensa

DMF - N,N-dimetilformamida

DP - estimativa do desvio padrão absoluto

EF - fator de enriquecimento

EPR - erro padrão relativo

FFD - delineamento fatorial fracionado

FLU - fluconazol

GC - cromatografia gasosa

GC-ECD - cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons

HCFMRP/USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

HF-LGLME - microextração líquido-ar-líquido com fibra oca

HF-LLLME - microextração líquido-líquido-líquido com fibra oca

HF-LPME - microextração em fase líquida com fibra oca

HPLC-PDA - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV

IL-DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos

IS - padrão interno

$K_{(\text{fase aceptora/fase doadora})}$ - coeficiente de partição entre as fases aceptora e doadora

$K_{(\text{fase orgânica/fase aceptora})}$ - coeficiente de partição entre as fases orgânica e aceptora

$K_{(\text{fase orgânica/fase doadora})}$ - coeficiente de partição entre as fases orgânica e doadora

LC-HRMS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

LC-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

LDS-SD-DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade e quebra da emulsão por solvente

LIQ - limite inferior de quantificação

LLE - extração líquido-líquido

LPME - microextração em fase líquida

LSQ - limite superior de quantificação

LT-DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva com solventes de menor toxicidade

MEKC - cromatografia eletrocinética micelar

MTBE - éter metil-terc-butílico

P-B - delineamento de Plackett-Burman

PPT - precipitação de proteínas

r - coeficiente de correlação

R - recuperação

R^2 - coeficiente de determinação

RSM - metodologia de superfície de resposta

SDME - microextração em gota suspensa

SPE - extração em fase sólida

SPME - microextração em fase sólida

TEA - trietilamina

TFA - ácido trifluoroacético

UPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

V_A - volume de fase aceptora

V_D - volume de fase doadora

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vii

1 INTRODUÇÃO GERAL **1**
1.1 Fluconazol 2
1.2 Delineamento experimental 10

2 OBJETIVOS **14**
2.1 Objetivos específicos 15

3 CAPÍTULO 1 - Desenvolvimento de um método para análise do fluconazol em amostras de líquor por DLLME/HPLC-PDA **16**
3.1 INTRODUÇÃO **17**
3.1.1 As técnicas de microextração 18
3.1.2 DLLME 18
3.1.3 Classificação 21
3.2 OBJETIVOS **23**
3.3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS **25**
3.3.1. Análise do FLU por HPLC 26
3.3.1.1 Equipamento 26
3.3.1.2 Colunas cromatográficas. 26
3.3.1.3 Reagentes e solventes 26
3.3.1.4 Soluções padrão 26
3.3.1.5 Seleção das condições analíticas 26
3.3.1.6 Seleção do IS 27
3.3.2 Otimização das condições para extração do FLU de amostras de CSF por DLLME 27
3.3.2.1 Equipamentos 28
3.3.2.2 Reagentes e solventes 28
3.3.2.3 Preparo das soluções e do CSF artificial 28
3.3.2.4 Seleção dos solventes extrator e dispersor 28
3.3.2.5 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da DLLME 29
3.3.2.6 Seleção da condição ótima de extração 30
3.3.3 Validação do método 32
3.3.3.1 Curva de calibração 32
3.3.3.2 LIQ 33
3.3.3.3 Precisão 33

3.3.3.4 Exatidão 33
3.3.3.5 Efeito residual 34
3.3.3.6 Seletividade 34
3.3.3.7 Recuperação 34
3.3.3.8 Estudo de estabilidade do fármaco em solução 35
3.3.3.9 Estudo de estabilidade do fármaco em CSF 35
3.3.3.10 Determinação da concentração de FLU em amostra de CSF de paciente em tratamento com o FLU 36
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
3.4.1 Análise do FLU por HPLC 38
3.4.1.1 Seleção das condições analíticas 38
3.4.1.2 Seleção do IS 40
3.4.2 Otimização das condições para extração do FLU de amostras de CSF por DLLME 41
3.4.2.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor 41
3.4.2.2 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da DLLME 42
3.4.2.3 Seleção da condição ótima de extração 46
3.4.3 Validação do método 51
3.4.3.1 Curva de calibração 51
3.4.3.2 LIQ 53
3.4.3.3 Precisão 53
3.4.3.4 Exatidão 54
3.4.3.5 Efeito residual 55
3.4.3.6 Seletividade 56
3.4.3.7 Recuperação 56
3.4.3.8 Estudos de estabilidade do fármaco em solução 56
3.4.3.9 Estudos de estabilidade do fármaco em CSF 57
3.4.3.10 Determinação da concentração de FLU em amostra de CSF de paciente em tratamento com o FLU 59
3.5 CONCLUSÕES 61

4 CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de um método para análise do fluconazol em amostras de plasma por HF-LPME/HPLC-PDA 63
4.1 INTRODUÇÃO 64
4.1.1 HF-LPME 65
4.1.2 Classificação da HF-LPME 66
4.2 OBJETIVOS 71
4.3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS 73
4.3.1 Equipamentos 74
4.3.2 Reagentes e solventes 74
4.3.3 Padrões e soluções padrão 74
4.3.4 Condição analítica 74
4.3.5 Preparo da fibra 74

4.3.6 Obtenção e preparo da amostra 75
4.3.7 HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH 75
4.3.8 HF-LPME de duas fases 75
4.3.9 HF-LPME de três fases mediada por carreador 76
4.3.9.1 Identificação dos parâmetros que infuenciam na eficiência da HF-LPME mediada por carreador 76
4.3.9.2 Seleção da condição ótima de extração 77
4.3.10 Validação do método 78
4.3.10.1 Curva de calibração 79
4.3.10.2 LIQ 79
4.3.10.3 Precisão 79
4.3.10.4 Exatidão 80
4.3.10.5 Efeito residual 80
4.3.10.6 Seletividade 80
4.3.10.7 Recuperação 80
4.3.10.8 Estudo de estabilidade do fármaco em plasma 81
4.3.10.9 Determinação da concentração de FLU em amostra de plasma de paciente em tratamento 82
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 83
4.4.1 HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH 84
4.4.2 HF-LPME de duas fases 85
4.4.3 HF-LPME de três fases mediada por carreador 86
4.4.3.1 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME mediada por carreador 90
4.4.3.2 Seleção da condição ótima de extração 94
4.4.4 Validação do método 101
4.4.4.1 Curva de calibração 101
4.4.4.2 LIQ 102
4.4.4.3 Precisão 103
4.4.4.4 Exatidão 103
4.4.4.5 Efeito residual 104
4.4.4.6 Seletividade 105
4.4.4.7 Recuperação 105
4.4.4.8 Estudos de estabilidade do fármaco em plasma 105
4.4.4.9 Determinação da concentração de FLU em amostra de plasma de paciente em tratamento 106
4.5 CONCLUSÕES 108

5 CONCLUSÕES GERAIS 110

REFERÊNCIAS 113

ANEXOS 133
Anexo A - Comprovante de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa 134

(WATERSON, 2010a)

1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Fluconazol (FLU)

Os fungos são micro-organismos encontrados em vários ambientes como solo, água, ar, plantas e animais. Algumas espécies apresentam potencial patogênico para o homem e podem levar ao desenvolvimento de micoses, que podem ser superficiais, subcutâneas ou sistêmicas. Para o tratamento destas doenças são utilizados os antifúngicos, contudo a terapêutica pode ser limitada por problemas de segurança, baixa eficiência e resistência microbiana (CORRÊA; SALGADO, 2011).

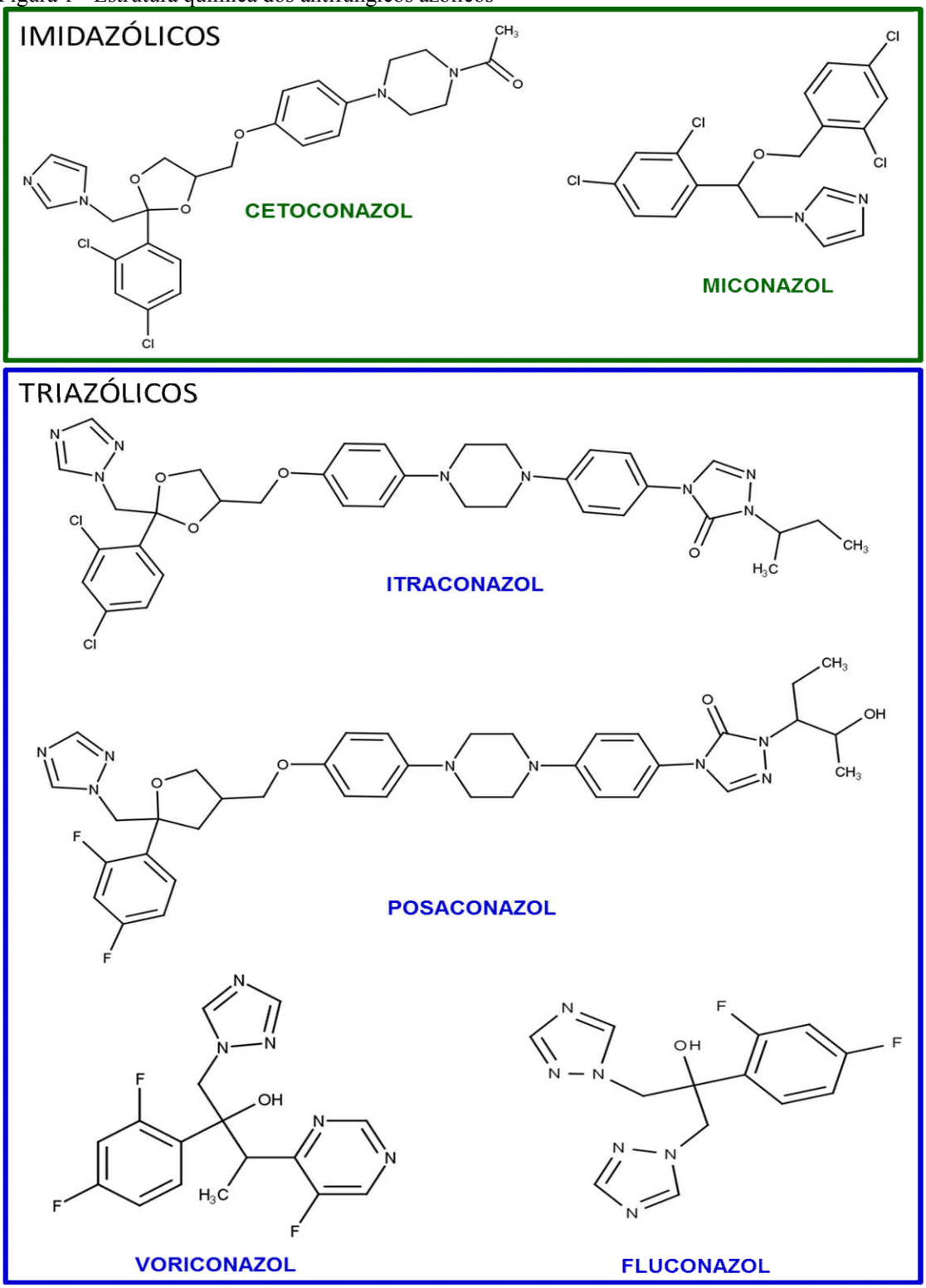
Até a década de 1940, o tratamento de infecções sistêmicas era limitado a poucas substâncias. A era da quimioterapia antifúngica teve início com a disponibilização da anfotericina B na década de 1950, fármaco que continua sendo o tratamento padrão para infecções graves até hoje, porém, os efeitos adversos relacionados à infusão e a nefrotoxicidade relacionada à dose levaram a busca por compostos menos tóxicos e que pudessem ser administrados por via oral e intravenosa (LEWIS, 2011). Por isso, a partir da década de 70, os compostos imidazólicos foram inseridos na prática clínica, fornecendo a possibilidade de administração por via oral e largo espectro de ação. Por fim, na década de 90, os compostos triazólicos foram descobertos, apresentando além das vantagens dos compostos imidazólicos, uma maior atividade e biodisponibilidade (MARTINEZ, 2006).

Os azóis são fármacos totalmente sintéticos e com tempo de meia-vida suficientemente longo para permitir uma terapia de uma a duas doses diárias. O seu mecanismo de ação é baseado na inibição da biossíntese do ergosterol, que é o principal componente da membrana celular dos fungos (CORRÊA; SALGADO, 2011; EKIERT; KRZEK; TALIK, 2010) e são classificados em imidazólicos e triazólicos, de acordo com o anel pentagonal de sua estrutura química (Figura 1). Os imidazólicos apresentam três carbonos e dois átomos de nitrogênio (cetoconazol e miconazol) e os triazólicos apresentam três atomos de nitrogênio e dois de carbono (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) (MARTINEZ, 2006), sendo que os últimos têm sítios de ação mais específicos e inibem a enzima citocromo P450 lanosterol 14-α-demetilase (Figura 2), o que compromete a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14-α-metilesteróis, compostos capazes de desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas de fosfolipídios. Desta maneira, ocorre o comprometimento das funções de sistemas enzimáticos ligados à membrana, como as enzimas do sistema de transporte de elétrons e a ATPase, o que ocasiona a inibição do crescimento dos fungos (ação fungistática) (CORRÊA; SALGADO, 2011;

.

EKIERT; KRZEK; TALIK, 2010).

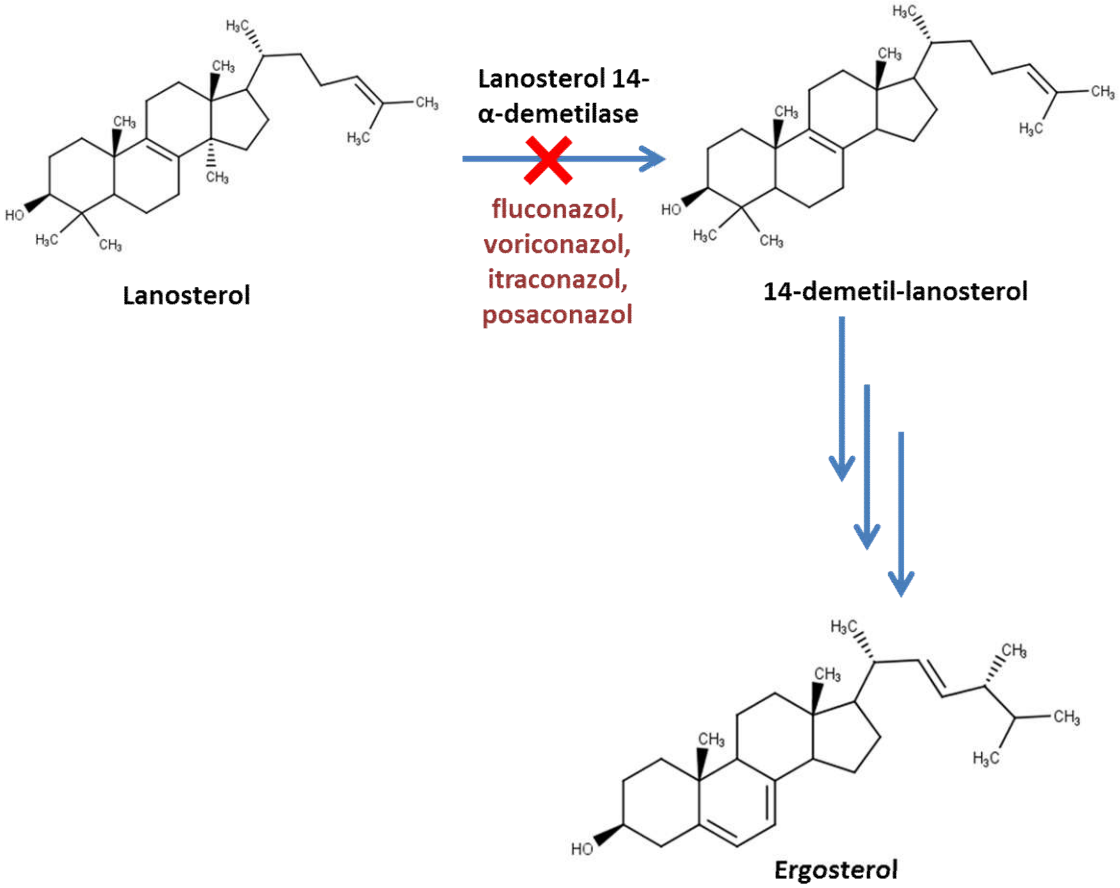
Figura 1 - Estrutura química dos antifúngicos azólicos



Fonte: elaborada pelo autor, com base em Lewis (2011).

.

Figura 2 - Mecanismo de ação dos triazóis



Fonte: elaborada pelo autor, com base em Corrêa e Salgado (2011) e Ekiert, Krzek e Talik (2010).

O FLU é um bistriazol desenvolvido na década de 1980 (BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005; HILLIS et al., 2004; WATTANANAT; AKARAWUT, 2006). É um antifúngico de amplo espectro de ação (BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005), indicado para o tratamento de dermatomicoses (HILLIS et al., 2004), meningites (BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005; CORRÊA; SALGADO, 2011) e candidíases orofaríngea, esofágica, vaginal e profunda (CORRÊA; SALGADO, 2011; PORTA, CHANG, STORPIRTIS, 2005). Também tem impacto na redução de infecções por *Candida* sp. em pacientes com neutropenia (CORRÊA; SALGADO, 2011), assim como pode ser útil na prevenção de infecções em pacientes submetidos a quimioterapia e radioterapia (JEBALIYA et al., 2013), na prevenção e no tratamento de infecções em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (GROSS et al., 2001; HILLIS et al., 2004) e na prevenção de sepse em pacientes queimados (SANTOS et al., 2010).

.

Este fármaco pode ser administrado por via intravenosa (CORRÊA; SALGADO, 2011; EKIERT; KRZEK; TALIK, 2010) ou por via oral. A biodisponibilidade, quando é administrado oralmente, é superior a 90 % (CARRASCO-PORTUGAL; FLORES-MURRIETA, 2007; JOVANOVIC et al., 2005; KIM et al., 2007), não sofrendo influência da presença de alimentos ou de alterações no pH gástrico (COUSIN et al., 2003; WILDFEUER et al., 1997). Concentrações plasmáticas de 4,6 e 9 $\mu g.mL^{-1}$ foram alcançadas no estado de equilíbrio, após a administração de doses múltiplas de 200 e 400 mg, respectivamente (COUSIN et al., 2003). Já quando o tratamento foi realizado com 800 mg por dia valores de concentração no soro de 17 a 60,5 $\mu g.mL^{-1}$ foram obtidos (SCHIAVE et al., 2018). Por se difundir facilmente, o FLU também pode ser encontrado em líquor (CSF), escarro, saliva e leite. No CSF as concentrações correspondem de 50 a 90 % dos níveis plasmáticos (CORRÊA; SALGADO, 2011; EKIERT; KRZEK; TALIK, 2010) como observado por Bafeltowska e Buszman (2005) que, por meio de análise de amostras provenientes de pacientes com meningites coccidioidal e criptocócica mostraram que doses de 50-400 mg por dia promovem a penetração substancial do FLU neste fluido.

O FLU é um composto pouco metabolizado e a maior parte do fármaco administrado (80 %) é eliminado inalterado na urina (BELAL et al., 2014; CARRASCO-PORTUGAL; FLORES-MURRIETA, 2007; EERKES; SHOU; NAIDONG, 2003). A baixa metabolização deve-se a estabilidade do anel triazólico ao ataque oxidativo, ao bloqueio estérico da hidroxila e ao bloqueio da hidroxilação aromática fornecida pela presença dos dois átomos de flúor (CORRÊA; REICHMAN; SALGADO, 2012). Aproximadamente 11 % do FLU são excretados na urina como metabólitos (JOVANOVIC et al., 2005), tendo sido identificados por Brammer et al. (1991) os conjugados glicuronídeos do fluconazol e o fluconazol N-óxido. Logo, a via renal é responsável por mais de 90 % da eliminação (CORRÊA; SALGADO, 2011) e o fármaco apresenta tempo de meia-vida de 25-30 horas (BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005; CORRÊA; SALGADO, 2011).

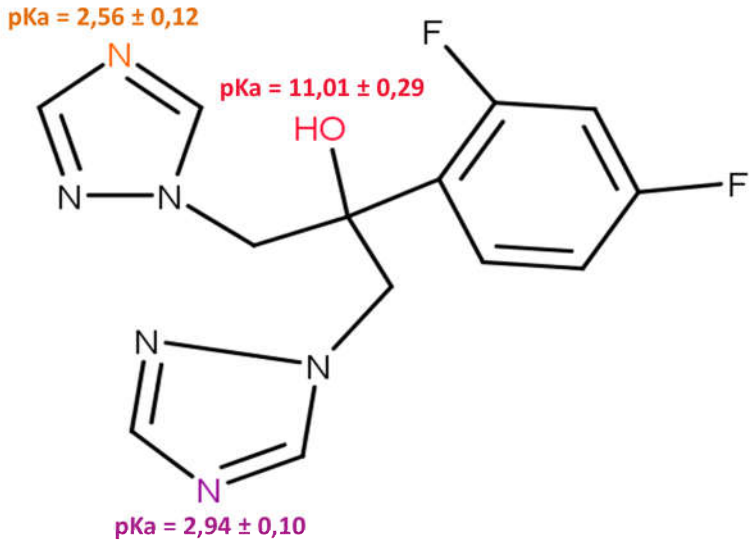
Este antifúngico possui ligação às proteínas plasmáticas de 11-12 % (BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005; CARRASCO-PORTUGAL; FLORES-MURRIETA, 2007; CORRÊA; SALGADO, 2011; KIM et al., 2007) e pode ter sua concentração plasmática diminuída pelo uso concomitante de indutores do CYP3A, como a rifampicina. Ao mesmo tempo, seu uso pode reduzir o metabolismo de medicamentos como a ciclosporina, a fenitoína, o ritonavir e a varfarina pela inibição do citocromo P450 (CYP), principalmente o CYP3A (MORAES et al., 1999).

.

As principais reações adversas do FLU são erupções cutâneas, náusea, vômito, dor abdominal, dor de cabeça e alopecia em pacientes que fazem tratamento prolongado com doses diárias de 400 mg (CORRÊA; SALGADO, 2011).

O FLU é uma base fraca, com log P = 0,5 a 37 ºC e fórmula molecular $C_{13}H_{12}F_2N_6O$. É um composto que apresenta alta estabilidade em solução aquosa e três valores de pKas: 11,01 ± 0,29; 2,94 ± 0,10 e 2,56 ± 0,12 (Figura 3). Além disso, o grupamento fenil contendo halogênios presente em sua estrutura promove o aumento da atividade antifúngica e da solubilidade em água, com consequente melhora de sua biodisponibilidade (CORRÊA; SALGADO, 2011; CORRÊA; REICHMAN; SALGADO, 2012).

Figura 3 - Estrutura química do FLU e grupos relacionados a sua ionização



Fonte: elaborada pelo autor, com base em Corrêa, Reichman e Salgado (2012).

A determinação da concentração de FLU em fluidos biológicos pode auxiliar na definição da dose a ser administrada (DECOSTERD et al., 2010; SAFAEI et al., 2015) e é de relevância clínica no tratamento de infecções causadas por fungos com baixa susceptibilidade ao fármaco, em pacientes com adesão terapêutica duvidosa ou em tratamentos com medicamentos que interferem em seu metabolismo e quando a farmacocinética é imprevisível (pacientes queimados, com rápido declínio da função renal ou em hemodiálise) (COCIGLIO et al., 1996; EGLE; TRITTLER; KUMMERER, 2004; MAJCHERCZYK et al., 2002; SANTOS et al., 2010). Entretanto, para se realizar a quantificação de fármacos em matrizes biológicas uma etapa de preparo de amostra é geralmente realizada com o intuito de extrair e

.

concentrar os analitos e remover grande parte dos componentes endógenos da matriz (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; XIA et al., 2012). Para isto, técnicas como a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE), a precipitação de proteínas e a filtração em membranas podem ser utilizadas. Uma das características da maioria destas técnicas é o uso de quantidades relativamente altas de solventes, que podem oferecer risco a saúde humana e podem ser prejudiciais ao meio ambiente (KOHLER; SCHAPPLER; RUDAZ, 2013). Outro inconveniente é que, muitas vezes, é requerido o uso de pelo menos um mililitro de amostra biológica, o que dificulta a determinação quando a quantidade é limitada.

Como pode ser visto na Tabela 1, para a análise do FLU em plasma, os métodos descritos na literatura utilizaram a LLE, a SPE, a precipitação de proteínas e a ultrafiltração e para a análise em CSF os métodos descritos utilizaram a LLE e a SPE, sendo que até o momento, nenhum estudo foi realizado para a determinação do FLU em matrizes biológicas fazendo uso de técnicas de microextração.

.

Tabela 1 - Métodos descritos na literatura para quantificação de FLU em amostras biológicas (continua)

Matriz biológica (quantidade)	Método de extração	Método de quantificação	Limite de quantificação	Referência
Líquor (20 µL)	SPE automatizada	LC-HRMS	0,040 µg.mL^{-1}	(QU et al., 2017)
Líquor (500 µL)	LLE	GC-ECD	0,100 µg.mL^{-1}	(REGE et al., 1992)
Líquor (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,200 µg.mL^{-1}	(WALLACE, et al., 1992)
Líquor (1 mL)	SPE	HPLC-UV	1,560 µg.mL^{-1}	(BAFELTOWSKA; BUSZMAN, 2005)
Líquor (--------)	LLE	HPLC-UV	0,500 µg.mL^{-1}	(SCHIAVE, et al., 2018)
Plasma (20 µL)	SPE automatizada	LC-HRMS	0,040 µg.mL^{-1}	(QU et al., 2017)
Plasma (50 µL)	PPT	LC-MS/MS	0,010 µg.mL^{-1}	(TOUSSAINT et al., 2017)
Plasma (50 µL)	LLE	LC-MS	0,500 µg.mL^{-1}	(EERKES; SHOU; NAIDONG, 2003)
Plasma (70 µL)	PPT	LC-MS/MS	0,010 µg.mL^{-1}	(WU et al., 2009)
Plasma (100 µL)	PPT	UPLC-MS/MS	0,010 µg.mL^{-1}	(DECOSTERD et al., 2010)
Plasma (100 µL)	PPT	LC-MS	0,050 µg.mL^{-1}	(HILLIS et al., 2004)
Plasma (100 µL)	LLE	GC-ECD	0,010 µg.mL^{-1}	(BEIJNEN et al., 1991)
Plasma (100 µL)	SPE automatizada	LC-MS/MS	0,014 µg.mL^{-1}	(BESTE; BURKHARDT, KAEVER, 2012)
Plasma (160 µL)	SPE in-line	LC-MS/MS	0,001 µg.mL^{-1}	(MITCHELL et al., 2010)
Plasma (200 µL)	LLE	HPLC-UV	0,400 µg.mL^{-1}	(SANTOS et al., 2010)
Plasma (200 µL)	LLE	MEKC	0,125 µg.mL^{-1}	(VONHEEREN et al., 1996)
Plasma (200 µL)	SPE off-line	LC-MS/MS	0,001 µg.mL^{-1}	(MITCHELL et al., 2010)
Plasma (240 µL)	Ultrafiltração	HPLC-UV	0,195 µg.mL^{-1}	(MAJCHERCZYK et al., 2002)
Plasma (300 µL)	SPE	HPLC-UV	0,050 µg.mL^{-1}	(GORDIEN et al., 2009)
Plasma (400 µL)	LLE	HPLC-UV	0,200 µg.mL^{-1}	(SASONGKO et al., 2003)
Plasma (450 µL)	PPT	HPLC-UV	0,061 µg.mL^{-1}	(SAFAEI et al., 2015)
Plasma (500 µL)	--------	HPLC-UV	0,400 µg.mL^{-1}	(COCIGLIO et al., 1996)
Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,050 µg.mL^{-1}	(KIM et al., 2007)
Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,100 µg.mL^{-1}	(KOKS et al., 1995)
Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,200 µg.mL^{-1}	(WALLACE, et al., 1992)
Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,250 µg.mL^{-1}	(PORTA, CHANG, STORPIRTIS, 2005)
Plasma (500 µL)	LLE	GC-ECD	0,100 µg.mL^{-1}	(REGE et al., 1992)
Plasma (500 µL)	SPE	HPLC-UV	0,200 µg.mL^{-1}	(WATTANANAT; AKARAWUT, 2006)
Plasma (500 µL)	SPE	LC-MS/MS	usado como IS	(BHARATHI et al., 2008)
Plasma (1 mL)	SPE	MEKC	0,125 µg.mL^{-1}	(VONHEEREN et al., 1996)

.

Tabela 1 - Métodos descritos na literatura para quantificação de FLU em amostras biológicas (conclusão)

Matriz biológica (quantidade)	Método de extração	Método de quantificação	Limite de quantificação	Referência
Plasma (1 mL)	LLE	HPLC-UV	0,125 $\mu g.mL^{-1}$	(LIEW et al., 2012)
Plasma (1 mL)	LLE	HPLC-UV	0,200 $\mu g.mL^{-1}$	(MCLACHLAN et al., 2001)
Plasma (1 mL)	LLE	HPLC-UV	0,100 $\mu g.mL^{-1}$	(CARRASCO-PORTUGAL; FLORES-MURRIETA, 2007)
Plasma (1 mL)	Não realizada	HPLC-UV	1,090 $\mu g.mL^{-1}$	(BELAL et al., 2014)
Plasma (--------)	LLE	HPLC-UV	0,500 $\mu g.mL^{-1}$	(DE SOUSA et al., 2011)
Plasma (--------)	LLE	HPLC-UV	0,050 $\mu g.mL^{-1}$	(YUAN et al., 2014)
Plasma (--------)	PPT	UPLC-MS/MS	0,010 $\mu g.mL^{-1}$	(SONG et al., 2015)
Plasma (--------)	PPT	LC-MS/MS	0,100 $\mu g.mL^{-1}$	(VERDIER et al., 2010)
Sangue (300 µL)	SPE	HPLC-UV	0,500 $\mu g.mL^{-1}$	(ZHANG et al., 2008)
Soro (20 µL)	PPT	UPLC-MS/MS	1,000 $\mu g.mL^{-1}$	(BASU et al., 2017)
Soro (100 µL)	PPT	LC-MS/MS	0,500 $\mu g.mL^{-1}$	(ALFFENAAR et al., 2010)
Soro (150 µL)	SPE in-line	HPLC-UV	0,650 $\mu g.mL^{-1}$	(EGLE; TRITTLER; KUMMERER, 2004)
Soro (500 µL)	LLE	HPLC-UV	0,200 $\mu g.mL^{-1}$	(WALLACE, et al., 1992)
Soro (1 mL)	LLE	HPLC-UV	0,300 $\mu g.mL^{-1}$	(JOVANOVIC et al., 2005)
Soro (--------)	PPT	LC-MS/MS	0,060 $\mu g.mL^{-1}$	(CHAHBOUNI et al., 2010)
Soro (--------)	LLE	HPLC-UV	0,500 $\mu g.mL^{-1}$	(SCHIAVE, et al., 2018)
Saliva (250 µL)	LLE	HPLC-UV	1,000 $\mu g.mL^{-1}$	(KOKS et al., 1995)
Urina (1 mL)	LLE	HPLC-UV	2,000 $\mu g.mL^{-1}$	(MCLACHLAN et al., 2001)
Urina (1 mL)	LLE	HPLC-UV	0,250 $\mu g.mL^{-1}$	(BARANOWSKA; MARKOWSKI; BARANOWSKI, 2009)
Urina (1 mL)	Não realizada	HPLC-UV	1,090 $\mu g.mL^{-1}$	(BELAL et al., 2014)
Urina (1 mL)	SPE	HPLC-UV	1,280 $\mu g.mL^{-1}$	(HERMAWAN et al., 2013)

LLE - extração líquido-líquido, PPT - precipitação de proteínas, SPE - extração em fase sólida, (--------) - informação não encontrada, GC-ECD - cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, HPLC-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, LC-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, MEKC - cromatografia eletrocinética micelar, LC-HRMS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, UPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*, LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*.

Já dentre as técnicas analíticas, a maioria utilizou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como demonstrado nos trabalhos de revisão de Corrêa e Salgado (2011) e Ekiert, Krzek e Talik (2010). Também estão disponíveis métodos utilizando a cromatografia

.

gasosa (GC), a eletroforese capilar (CE), a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (UPLC-MS/MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (Tabela 1).

Assim, esta tese descreverá o desenvolvimento de métodos para a quantificação do FLU em amostras biológicas empregando microextrações líquidas: a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para amostras de plasma e a microextração líquido-líquido dispersiva **(**DLLME) para amostras de CSF e fará uso de delineamentos experimentais para a otimização das condições analíticas.

1.2 Delineamento experimental

Tradicionalmente em química analítica, a avaliação da influência dos parâmetros sobre a resposta é estudada de forma isolada para cada variável, ou seja, a variável de interesse é estudada em vários níveis enquanto as demais variáveis envolvidas no processo são mantidas em valores fixos. Entre as desvantagens da utilização desta estratégia estão a impossibilidade de avaliar a interação entre os fatores, o alto número de experimentos necessários e o alto consumo de reagentes e de tempo para a realização das análises (BEZERRA et al., 2008).

Os inconvenientes apresentados podem ser estrategicamente solucionados pela aplicação dos delineamentos experimentais (FERREIRA et al., 2004; ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014), cujo uso tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento da transferência de conhecimentos e da colaboração entre universidade e indústria, à larga difusão de programas estatísticos e à necessidade de análise sistemática dos dados experimentais (ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014).

Estudos publicados recentemente abordam o seu uso nas áreas de métodos analíticos em geral (FERREIRA et al., 2004; FERREIRA et al., 2007a; KUMAR et al., 2014), métodos cromatográficos (FERREIRA et al., 2007b; HIBBERT, 2012), métodos eletroforéticos (HANRAHAN; MONTES; GOMEZ, 2008; ORLANDINI; GOTTI; FURLANETTO, 2014; SENTELLAS; SAURINA, 2003) e para a otimização de técnicas de extração (GIACOMINO et al., 2011; STALIKAS et al., 2009).

Os delineamentos podem ser classificados como de primeira ordem, que estão geralmente relacionados com a triagem dos fatores que exercem influência na eficiência do método e as variáveis são estudadas em apenas dois níveis (DEJAEGHER; HEYDEN, 2011; FERREIRA et al., 2004) e em delineamentos de segunda ordem, que por serem mais

.

complexos, podem ser utilizados para a obtenção das condições ótimas de análise após a identificação dos fatores importantes para o processo (FERREIRA et al., 2007a).

Entre os de primeira ordem estão: o delineamento de Plackett-Burman - P-B (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009), o delineamento fatorial fracionado (FFD) (SERESHTI; KHOJEH; SAMADI, 2011) e o delineamento fatorial completo (CFD) (FERREIRA et al., 2007a). O CFD é comumente preterido em relação ao FFD quando o número de variáveis é superior a quatro, já que seu número de experimentos é calculado pela fórmula 2^k, sendo k o número de variáveis. E o delineamento P-B, por sua vez, é um tipo particular de delineamento fatorial fracionado, no qual são obtidos apenas os efeitos principais, devido ao reduzido número de experimentos da matriz gerada (BIANCHI; CARERI, 2008).

Já entre os de segunda ordem estão: o delineamento de Box-Behnken (BBD), o delineamento Doehlert e o delineamento composto central (CCD) (FERREIRA et al., 2007a).

O BBD permite estimar coeficientes de interação de primeira e segunda ordens (BORGES et al., 2009) e é mais econômico e eficiente que os delineamentos 3^k, principalmente quando o número de variáveis é grande (BEZERRA et al., 2008). Outra característica deste delineamento é não possuir combinações nas quais todos os fatores estão simultaneamente nos seus níveis altos e baixos, o que evita a realização de experimentos em condições extremas (FERREIRA et al., 2007a; LI et al., 2013) e seus fatores são avaliados em três níveis (-1, 0, +1) (BEZERRA et al., 2008).

Já o CCD constitui-se de um delineamento fatorial 2^k com pontos adicionais (pontos estrelas) e pelo menos um ponto no centro da região experimental para a obtenção de ortogonalidade ou rotacionalidade (FERREIRA et al., 2004; KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011). É o delineamento mais popular para a otimização de métodos (HIBBERT, 2012) e todos os fatores são estudados em cinco níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) (BEZERRA et al., 2008).

Por fim, o delineamento Doehlert apresenta alta eficiência, com distribuição uniforme dos intervalos entre os níveis e possibilidade de deslocamento da matriz para outra região experimental utilizando-se de pontos adjacentes previamente estudados. Neste delineamento, as variáveis podem ser estudadas em diferentes níveis, porém com a desvantagem de não apresentar rotacionalidade (BEZERRA et al., 2008).

Desta forma, tem-se que os principais passos para a execução de experimentos envolvem as etapas descritas na Figura 4. Primeiramente devem ser selecionados os fatores

.

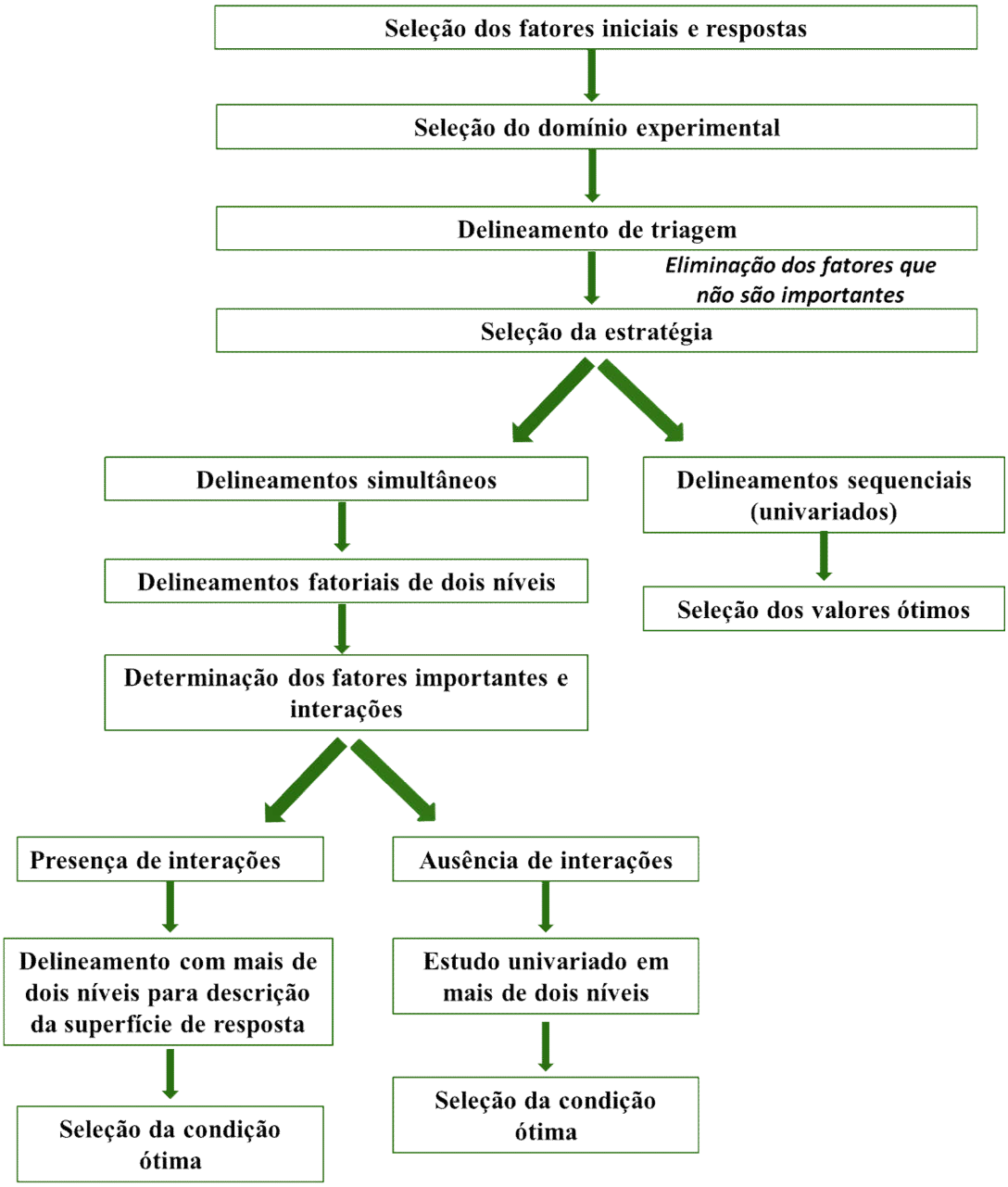
(variáveis independentes) e a região experimental deve ser delimitada. Caso a estratégia selecionada seja a de delineamentos simultâneos, um delineamento de primeira ordem pode ser realizado com a finalidade de realizar a triagem dos fatores de maior relevância para o estudo e para a identificação de possíveis interações. Na ausência de interações entre as variáveis, pode-se seguir o estudo com a realização de estudos univariados com mais de dois níveis, porém, quando as interações são identificadas nesta etapa, deve-se selecionar um delineamento de segunda ordem para ser utilizado (BBD, CCD ou delineamento Doehlert). A partir dos dados gerados, pode-se então desenvolver a metodologia de superfície de resposta (RSM) assim como pode ser definida a condição ótima de análise realizando-se o cálculo da desejabilidade (BEZERRA et al., 2008; MASSART et al., 2008).

A RSM é uma das mais relevantes técnicas multivariadas utilizadas na otimização de procedimentos analíticos e compõe um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas que se baseiam no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais. É útil para a previsão do comportamento do sistema (BEZERRA et al., 2008), podendo ser obtidos gráficos que auxiliam na previsão da resposta e para a obtenção dos valores ótimos para cada fator estudado (BEZERRA et al., 2008; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011).

O cálculo da desejabilidade, por sua vez, é uma função muito utilizada em metodologias multicritérios. Neste caso, as propriedades medidas para cada resposta são transformadas em uma escala de desejabilidade sem dimensão, que varia de d = 0 para resposta completamente indesejável até d = 1 para resposta totalmente desejada, o que torna possível a combinação de resultados obtidos de variáveis com diferentes ordens de magnitude. A desejabilidade total (D_{total}) é definida como a média geométrica ponderada das desejabilidades individuais (d). (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2007a).

.

Figura 4 - Principais etapas de realização de experimentos para a otimização de uma resposta



Fonte: elaborada pelo autor, com base em Massart et al. (1998).

Nos capítulos apresentados nesta tese a otimização das condições de extração do FLU a partir de amostras de plasma e CSF foram realizadas com o auxílio de FFD, CCD, RSM e D_{total}.

.

(WATERSON, 2007)

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar métodos para análise do FLU em amostras biológicas (plasma e CSF), utilizando como técnicas de preparo de amostra as microextrações HF-LPME e DLLME.

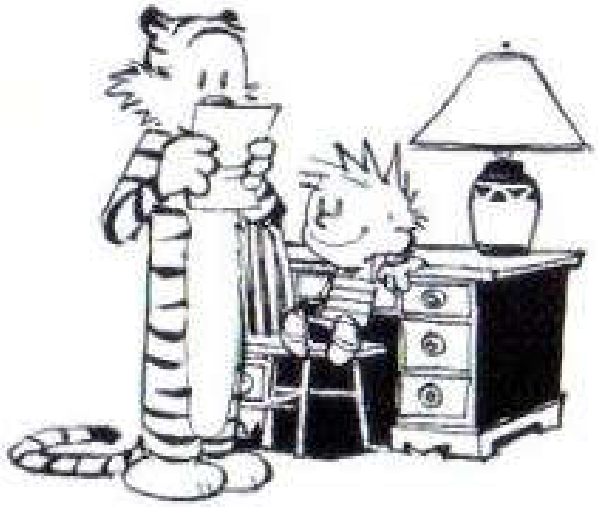
2.1 Objetivos específicos

- Avaliar as condições para análise do FLU por HPLC-PDA;

- Desenvolver e validar um método para análise do FLU em amostras de CSF por DLLME com o auxílio de delineamentos experimentais;

- Desenvolver e validar um método para análise do FLU em amostras de plasma por HF-LPME com o auxílio de delineamentos experimentais;

- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados em amostras biológicas de um paciente que realizou tratamento com o FLU no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (HCFMRP/USP).



(WATERSON, 2007)

3 CAPÍTULO 1

Desenvolvimento de um método para análise do fluconazol em amostras de líquor por DLLME/HPLC-PDA

(WATERSON, 2010b)

3.1 INTRODUÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 As técnicas de microextração

Análises de amostras biológicas são de difícil realização devido à complexidade da matriz, às baixas concentrações dos analitos e de seus metabólitos e ao limitado volume das amostras, porém, são importantes para obtenção de informações farmacocinéticas, toxicocinéticas, de bioequivalência e para investigações forenses e de exames antidoping em esportes (PRABU; SURIYAPRAKASH, 2012; ZARGAR; HATAMIE, 2014).

A LLE é uma técnica de preparo de amostras amplamente aceita e muito utilizada para a análise de fármacos em fluidos biológicos. Embora seja bastante robusta, ela demanda trabalho laboratorial intenso, apresenta baixo potencial de automação, tendência à formação de emulsão e requer o uso de grande volume de solventes de alta pureza, o que também contribui com a produção de resíduos laboratoriais (EBRAHIMPOUR*;* YAMINI; ESRAFILI, 2011; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007).

Assim, com o intuito de desenvolver técnicas de preparo de amostra eficientes, rápidas e econômicas que pudessem diminuir o volume de amostra e o uso de solventes tóxicos, esforços foram realizados visando o uso de solventes ambientalmente adequados ou a miniaturização das técnicas já existentes (AGUIRRE et al., 2015; OJEDA; ROJAS, 2009; PROSEN, 2014; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008). Neste último grupo apresentado destacam-se as microextrações em fase sólida (SPME) (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; REZAEE et al., 2006) e as microextrações em fase líquida (LPME). As LPMEs utilizam quantidade de solvente da ordem de microlitros (ZARGAR; HATAMIE, 2014) e podem ser divididas em três categorias principais: HF-LPME, a microextração em gota suspensa (SDME) e a DLLME (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; MORADI; YAMINI; BAHERI, 2011; REZAEE et al., 2006; ZARGAR; HATAMIE, 2014).

3.1.2 DLLME

A DLLME é uma técnica de microextração em fase líquida, desenvolvida por Rezaee et al. em 2006 e que foi primeiramente utilizada para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água. É baseada, assim como a LLE, no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases, todavia, o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente devido à utilização de um sistema ternário de solventes composto por solvente extrator, solvente dispersor e amostra aquosa, sendo que o solvente dispersor proporciona aumento da área de contato entre o analito a ser extraído e o solvente extrator e acelera o processo de

transferência de massa (HUO et al., 2011; LIANG; SANG, 2008; LOPEZ-DARIAS et al., 2010; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009).

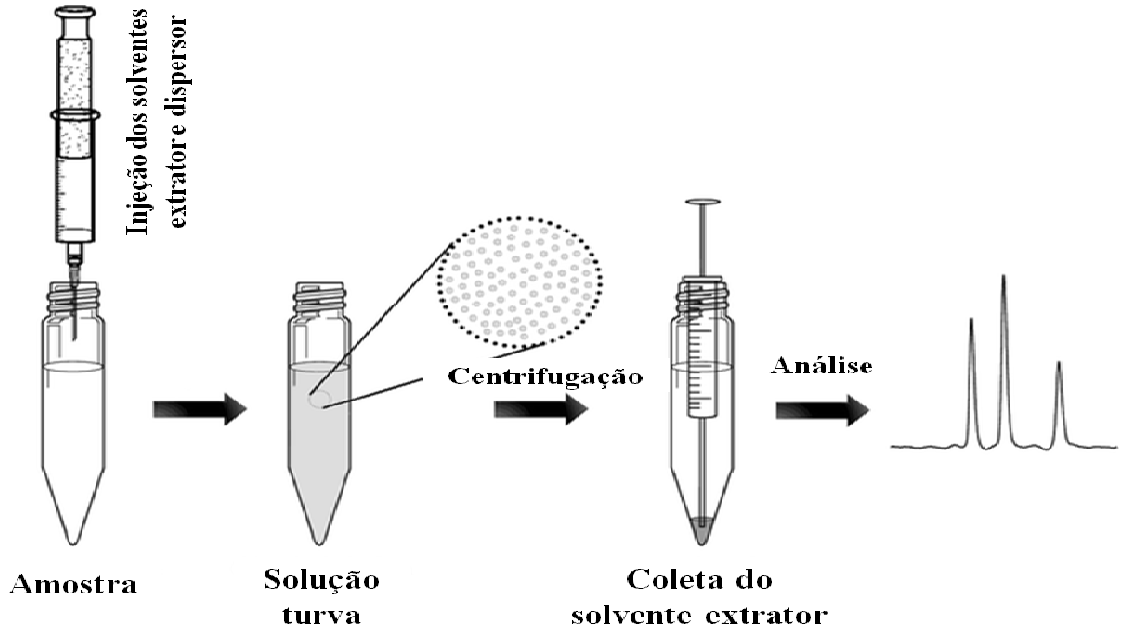
A utilização da DLLME é mais difundida para o preparo de amostras em matrizes simples como amostras de água. Entretanto, atualmente esta técnica tem sido utilizada para matrizes complexas como alimentos e amostras biológicas. Podem ser citados como exemplos para matrizes biológicas os trabalhos de Mashayekhi et al. (2010) para análise de carbamazepina em amostras de água, plasma e urina, de Saraji, Boroujeni e Bidgoli (2011) para análise de fentanil, alfentanil e sufentanil em amostras de plasma e urina, de Moreira et al. (2015) para quantificação de oxibutinina e seu metabólito em amostras de urina e de Alcântara et al. (2016) para a determinação de levetiracetam em amostras de plasma. Todavia, ressalta-se que a DLLME nunca foi utilizada para a extração de fármacos que possam estar presentes no CSF, talvez devido à dificuldade de obtenção deste tipo de matriz.

Esta microextração pode ser realizada utilizando-se solventes extratores de alta ou baixa densidade, desde que estes sejam insolúveis na amostra e capazes de extrair o composto de interesse (HUO et al., 2011; LIANG; SANG, 2008; REZAEI et al., 2008; YAN et al., 2011; ZANG et al., 2009). Os solventes de alta densidade comumente utilizados são os hidrocarbonetos halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano e tetracloroetileno (HUO et al., 2011; LIANG; SANG, 2008; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009) e entre os solventes de baixa densidade estão: 1-undecanol, *n*-hexadecano, 2-dodecanol, 1-decanol e 1-dodecanol (AHMADI-JOUIBARI; FATTAHI; SHAMSIPUR, 2014; HOU et al., 2014; JIA et al., 2013). Além dos solventes acima mencionados, pode-se utilizar líquidos iônicos, que podem ser injetados diluídos em sistemas analíticos como o equipamento de HPLC e são menos tóxicos (RAO; RAJU; VALI, 2013). Já os solventes dispersores têm como principal característica serem solúveis tanto na fase doadora quanto na fase aceptora e os mais empregados são o metanol, o etanol, a acetonitrila, a acetona e o tetraidrofurano (AHMADI-JOUIBARI; FATTAHI; SHAMSIPUR, 2014; HUO et al., 2011; YAN et al., 2011; ZANG et al., 2009).

A extração procede-se de acordo com a Figura 5. O solvente extrator e o solvente dispersor são rapidamente injetados na amostra aquosa com uma seringa e esse processo promove a formação de uma solução turva. Após a centrifugação, as gotículas do solvente extrator se depositam na parte inferior do tubo de fundo cônico e são retiradas com uma microsseringa para posterior análise (FARAJZADEH; DJOZAN; BAKHTIYARI, 2010; KOCÚROVÁ et al., 2012; REZAEE et al., 2006; ZANG et al., 2009).

Os volumes normalmente utilizados em DLLME são de 20 a 100 µL de solvente extrator e de 0,5 a 2 mL de solvente dispersor. O volume de amostra varia entre 5 e 10 mL e o tempo de extração compreendendo o preparo da amostra, injeção dos solventes e a etapa de centrifugação é geralmente inferior a 10 minutos (LEONG; FUH; HUANG, 2014). Logo, as vantagens desta técnica incluem simplicidade de operação, baixo tempo de extração, rapidez, baixo custo, alto fator de enriquecimento e alta recuperação do analito (OJEDA; ROJAS, 2009; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008; ZANG et al., 2009).

Figura 5 - Procedimento da DLLME



Fonte: Saraji e Boroujeni (2014) - reproduzida e traduzida com permissão da Springer.

A principal desvantagem da técnica é a necessidade de centrifugação, etapa de maior duração e que dificulta a automação da técnica (ANDRUCH et al., 2012; KOCÚROVÁ et al., 2012; REZAEI et al., 2008).

A avaliação dos fatores como força iônica e pH da amostra, tipo de solvente extrator e dispersor, volume de solvente extrator e dispersor empregado pode ser realizada com o intuito de aumentar a eficiência de extração desta técnica (CALDAS; COSTA; PRIMEL, 2010; HUO et al., 2011; REZAEE et al., 2006). Fatores como tempo de extração, velocidade e tempo de centrifugação também podem ser considerados para a realização dos experimentos (PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009).

3.1.3 Classificação da DLLME

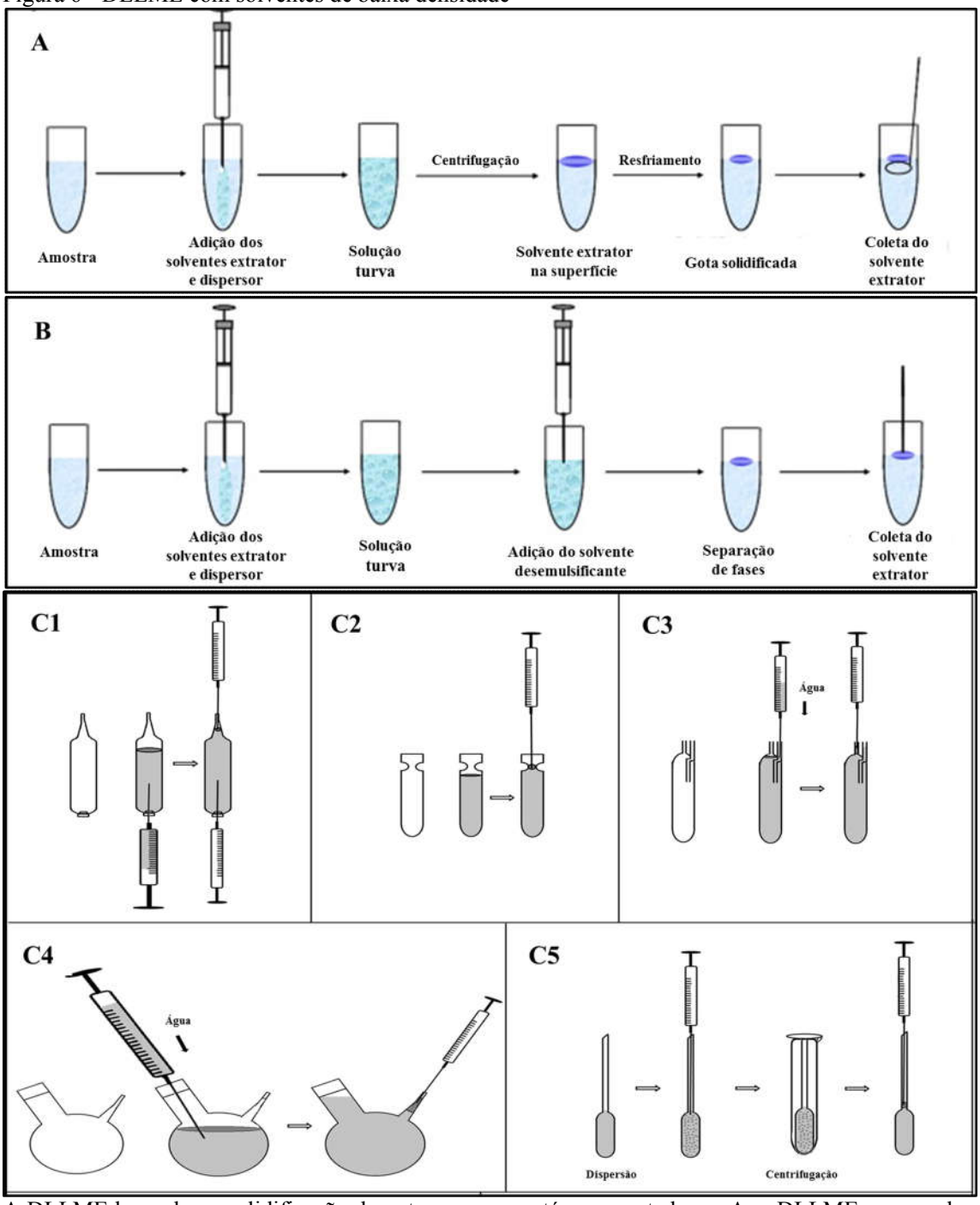
Entre as DLLMEs que fazem uso de solventes de baixa densidade encontram-se: a DLLME baseada na solidificação da gota suspensa (DLLME-SFO), a DLLME com quebra da emulsão por solvente (LDS-SD-DLLME) e a DLLME com auxílio de dispositivos especiais de extração (LEONG; FUH; HUANG, 2014) (Figura 6).

A DLLME-SFO foi introduzida por Khalili-Zanjani et al. em 2007 e, embora utilize um volume de solvente muito reduzido, possui taxa de extração inferior em relação à DLLME convencional. Na DLLME com auxílio de dispositivos especiais de extração, a adição de água à amostra é realizada com o objetivo de auxiliar a expulsão do solvente extrator do dispositivo utilizado e a LDS-SD-DLLME não necessita de centrifugação, sendo realizada em no máximo 2 a 3 minutos, pois faz uso de um solvente desemulsificante, como a acetona, para a separação de fases (LEONG; FUH; HUANG, 2014).

Já entre as DLLMEs com solventes extratores de alta densidade estão a DLLME convencional, que utiliza solventes clorados, a DLLME com solventes de menor toxicidade (LT-DLLME), desenvolvida por Leong et al. em 2010, e que utiliza solventes como o bromocicloexano (EMIDIO; DA SILVA; DE MARCHI, 2015) e o 1-bromo-3-metilbutano (LEONG et al., 2010; LEONG; FUH; HUANG, 2014; PENG et al., 2016) e a DLLME com líquidos iônicos (IL-DLLME) (TRUJILLO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Além disso, para auxiliar na dispersão dos solventes na amostra podem ser utilizados o micro-ondas, o ultrassom, o vórtex, a agitação manual e a agitação magnética e como substitutos do solvente dispersor podem ser empregados tensoativos e ar (LEONG; FUH; HUANG, 2014; ZHANG et al., 2011).

Figura 6 - DLLME com solventes de baixa densidade



A DLLME baseada na solidificação da gota suspensa está representada em A, a DLLME com quebra da emulsão por solvente está representada em B e alguns dos dispositivos especiais de extração que podem ser utilizados estão demonstrados em C.

Fonte: Leong, Fuh e Huang (2014) e Kocúrová et al. (2012) - reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier.

(WATERSON, 2008)

3.2 OBJETIVOS

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos são:

- Avaliar as condições para análise do FLU por HPLC-PDA;

- Desenvolver e validar um método para extração do FLU em amostras de CSF por DLLME com o auxílio de delineamentos experimentais;

- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de um paciente que realizou tratamento com o FLU no HCFMRP/USP.

(WATERSON, 2007)

3.3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.3.1 Análise do FLU por HPLC

3.3.1.1 Equipamento

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) composto por uma bomba LC-20T, injetor SIL-10AF, forno CTO-20A, detector SPD-M20A, controlador CBM-20A, desgaseificador DGU-20A5R, válvula LPGE Kit e software LC Solutions.

3.3.1.2 Colunas cromatográficas

Os testes iniciais foram realizados em coluna Lichrospher® RP 18 (125 mm x 4,6 mm, 5 µm) e coluna de guarda Lichrospher® RP 18 (10 mm x 4,6 mm, 5 µm). Os testes subsequentes foram realizados em coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). A primeira coluna foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha) e a segunda da Supelco (Bellefonte, Estados Unidos).

3.3.1.3 Reagentes e solventes

A água ultrapura utilizada no preparo da fase móvel foi obtida do sistema de purificação de água da marca Gehaka, modelo MS 2000 (São Paulo, Brasil). Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau cromatográfico. O metanol e a acetonitrila foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o etanol foi adquirido da J.T Baker (Phillipsburg, Estados Unidos). A trietilamina (TEA) e o ácido trifluoroacético (TFA) foram obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos).

3.3.1.4 Soluções padrão

O FLU e a fenacetina, utilizada como padrão interno (IS), de pureza superior a 98 %, foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). As soluções estoque de FLU e do IS (1 $mg.mL^{-1}$) foram preparadas em metanol e armazenadas a -20 ºC em frasco âmbar. As soluções de trabalho nas concentrações de 1 a 250 $\mu g.mL^{-1}$ para o FLU e de 50 $\mu g.mL^{-1}$ para o IS também foram preparadas em metanol, a partir da solução estoque, e foram armazenadas nas mesmas condições.

3.3.1.5 Seleção das condições analíticas

Para todos os testes foi selecionado comprimento de onda de 210 nm para visualização

do pico do FLU e a concentração de 30 $\mu g.mL^{-1}$ de solução padrão de FLU. Inicialmente, com o uso da coluna Lichrospher® RP 18, a eluição do FLU foi avaliada utilizando-se fase móvel composta por metanol:água nas proporções de 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 25:75 e 20:80 (v/v), vazão de 1 $mL.min^{-1}$ e temperatura de 30 °C. Também foi avaliada a eluição utilizando-se a combinação acetonitrila:água nas mesmas proporções utilizadas anteriormente e nas proporções de 15:85 e 10:90, mantendo-se a vazão e temperatura nos valores acima mencionados. Devido a resultados insatisfatórios, também foi avaliada a fase móvel composta por metanol:fase aquosa na proporção 30:70 (v/v), adição de TFA na fase aquosa (0,10 % e 0,01 %) e a adição conjunta de TEA 0,05 % e TFA 0,1 %.

Com o propósito de não utilizar aditivos na fase móvel, optou-se também por estudar o comportamento do FLU na coluna Ascentis® Express C 18. Neste caso, foram avaliadas as seguintes combinações de solventes: acetonitrila:água, etanol:água e metanol:água nas condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições avaliadas para a análise do FLU por HPLC com o uso da coluna Ascentis® Express C 18

Solventes	Proporção	Temperatura	Vazão
acetonitrila:água	50:50 a 10:90 (v/v)	30 e 40 °C	1,0 $mL.min^{-1}$
metanol: água	30:70 a 20:80 (v/v)	30 e 40 °C	0,8 e 1,0 $mL.min^{-1}$
etanol:água	40:60 a 10:90 (v/v)	30, 35, 40 e 45 °C	0,8; 0,9 e 1,0 $mL.min^{-1}$

3.3.1.6 Seleção do IS

A adição de IS é importante, pois corrige erros provenientes de manipulações da amostra, de variações em volumes de injeção e também pode melhorar a precisão (CASSIANO et al., 2009; MAYER, 2001). A escolha de um IS deve levar em consideração a resolução entre o padrão e os compostos de interesse. Além disso, o IS deve apresentar alta pureza, não deve reagir com os componentes da amostra e deve possuir características físico-químicas semelhantes aos compostos analisados e eluição em tempo de retenção próximo aos dos sinais analíticos dos demais analitos (LIGIERO et al., 2009). Para a seleção do IS foram avaliados os compostos que podem permanecer em sua forma não ionizada no mesmo intervalo de pH que o FLU, visto que esta condição contribui para a recuperação. Entre eles estão: lidocaína, tramadol, albendazol, atenolol, sinvastatina, cimetidina, sulfametazina, fenacetina e lamotrigina.

3.3.2 Otimização das condições para extração do FLU de amostras de CSF por DLLME

3.3.2.1 Equipamentos

Foram utilizados durante esta etapa uma centrífuga Hitachi modelo CF 16RN (Hitachinaka, Japão), uma balança analítica da marca Sartorius modelo MSU225P (Goettingen, Alemanha), uma balança Bioprecisa modelo JA3003N (Curitiba, Brasil), um pHmetro MS Technopon modelo mPA-210 (Piracicaba, Brasil), um agitador vórtex Ika modelo MS3 (Staufen, Alemanha) e um banho-maria modelo 1102 da Fanem (Guarulhos, Brasil).

3.3.2.2 Reagentes e solventes

A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação da marca Gehaka, modelo MS 2000 (São Paulo, Brasil). O clorofórmio e o tetracloroetileno foram obtidos da Tedia (Fairfield, Estados Unidos) e o diclorometano e a acetona da Mallinckrodt (Linköping, Suécia). A acetonitrila, o metanol, o isopropanol, a *d*-glicose e o bicarbonato de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o etanol da J.T. Baker (Phillipsburg, Estados Unidos). O cloreto de sódio, o cloreto de potássio e o fosfato de sódio monobásico foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil) e o cloreto de magnésio tetra-hidratado da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Por fim, o fosfato de sódio dibásico anidro e o cloreto de cálcio di-hidratado foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil).

3.3.2.3 Preparo das soluções e do CSF artificial

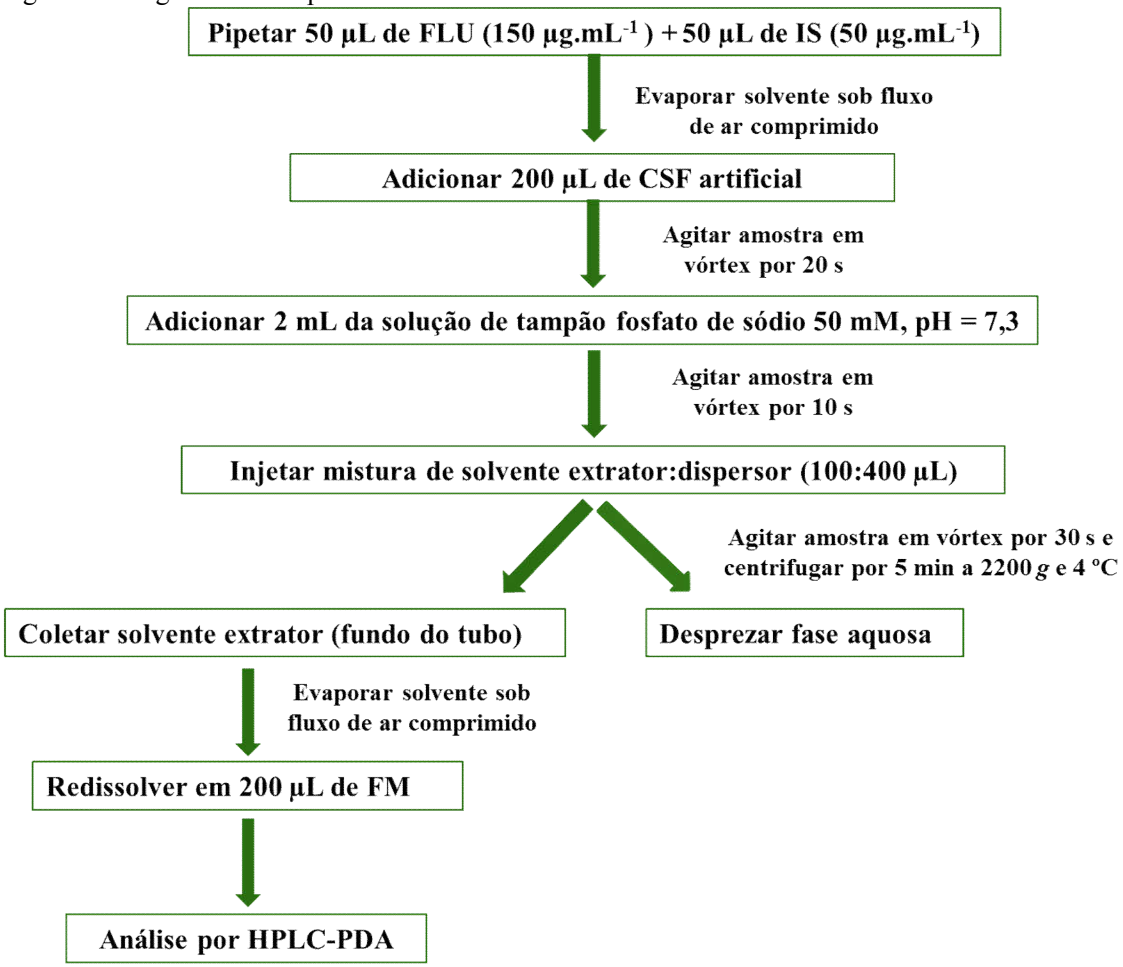
O preparo das soluções de trabalho contendo o FLU e o IS foi realizado de acordo com o item 3.3.1.4. O CSF artificial foi preparado de acordo com o trabalho de Dunn, Storm e Feller (2009) e é composto por *d*-glicose (11 $mmol.L^{-1}$), cloreto de potássio (2,5 $mmol.L^{-1}$), bicarbonato de sódio (26,2 $mmol.L^{-1}$), cloreto de sódio (119 $mmol.L^{-1}$), fosfato de sódio monobásico (1 $mmol.L^{-1}$), cloreto de magnésio (1,3 $mmol.L^{-1}$) e cloreto de cálcio (2,5 $mmol.L^{-1}$).

3.3.2.4 Seleção dos solventes extrator e dispersor

O clorofórmio, o diclorometano e o tetracloroetileno foram estudados como solvente extrator e a acetona, o isopropanol, a acetonitrila e o etanol como solvente dispersor. O clorobenzeno não foi avaliado devido ao tempo necessário para sua evaporação após a coleta da fase sedimentada. A combinação de cada solvente extrator com os quatro solventes dispersores foi realizada de modo a se obter 12 misturas de solventes extrator/dispersor. O procedimento foi realizado em triplicata (n = 3) em tubos de fundo cônico, conforme

diagrama descrito na Figura 7. Nesta etapa foi utilizado volume de 2 mL da solução tampão fosfato de sódio para ajuste do pH da amostra.

Figura 7 - Diagrama das etapas realizadas na DLLME



Fonte: elaborada pelo autor.

3.3.2.5 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da DLLME

As variáveis volume de solvente extrator, volume de solvente dispersor, concentração de NaCl (%), tempo de agitação por vórtex, tempo de centrifugação, volume de solução fosfato de sódio e pH da amostra foram inicialmente avaliadas pelo FFD ($2^{k-p} = 2^{7-3}$) de resolução IV, no qual k compreende o número de variáveis, p corresponde a ordem de redução do fatorial completo e $2^k/(1/2)^p$ corresponde a quantidade de experimentos a serem realizados (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005). As áreas do FLU e do IS foram utilizadas como resposta, assim como o volume de fase sedimentada formada. O delineamento envolveu a realização de 16 diferentes condições de extrações, que foram randomizadas e realizadas em

triplicata n = 48 e estão descritas na Tabela 3. Já os níveis dos fatores avaliados encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 3 - Condições de extração por DLLME realizadas no FFD $2^{(7-3)}$

Análise	Volume de solvente extrator (µL)	Volume de solvente dispersor (µL)	NaCl (%)	pH	Tempo de agitação (s)	Tempo de centrifugação (min)	Volume de fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (mL)
1	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
2	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00
3	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00
4	-1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00
5	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00
6	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00
7	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00
8	-1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00
9	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00
10	1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00
11	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00
12	1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00
13	1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00
14	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00
15	1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00
16	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabela 4 - Fatores e níveis para a construção da matriz do FFD $2^{(7-3)}$

Fatores	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)
NaCl (%)	0	5
pH	4	10
Tempo de agitação (s)	0	60
Tempo de centrifugação (min)	2	10
Volume de solvente extrator (µL)	100	300
Volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (mL)	1	5
Volume de solvente dispersor (µL)	100	700

3.3.2.6 Seleção da condição ótima de extração

Após a realização do FFD procedeu-se a realização do CCD para as variáveis que apresentaram efeitos significativos na área do FLU. Foram consideradas três variáveis (volume de solvente extrator, volume de solução de fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} e tempo de agitação) que foram avaliadas em 5 níveis (Tabela 5). O número de pontos do CCD foi definido pela equação: $N = 2^k + 2k + N_0$, na qual k é o número de variáveis e N_0 é o número de pontos centrais (TALEBIANPOOR et al., 2014). Foram gerados 20 experimentos, realizados em triplicata (n = 60), cujas condições encontram-se dispostas na Tabela 6. As

demais variáveis foram mantidas nos valores de 420 µL de solvente dispersor, 5 minutos de centrifugação a 2200 *g* e 4 ºC, pH da solução para diluição da amostra (solução fosfato de sódio) igual a 7,3 e 0 % de NaCl. Ressalta-se que o volume de solvente dispersor foi mantido em 420 µL para garantir que em todos os testes realizados o volume de solvente extrator fosse igual ou inferior ao volume de solvente dispersor.

Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no CCD

	Níveis			Pontos estrela (α = 1,68)	
Fatores	**Baixo (-1)**	**Central**	**Alto (+1)**	**-α**	**+α**
Volume de solvente extrator (µL)	150	250	350	82	418
Volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (mL)	1,0	2,5	4,0	0	5,0
Tempo de agitação (s)	26	58	90	4	112

Tabela 6 - Condições de extração por DLLME realizadas no CCD

Análise	**x_1 = volume de solvente extrator (µL)**	**x_2 = tempo de agitação (s)**	**x_3 = volume de fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (mL)**
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00	-1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	1,00	1,00	-1,00
5	-1,00	-1,00	1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	-1,00	1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Após a realização do CCD, gráficos de superfície de resposta foram construídos para os fatores que exerceram efeito sobre a área. Para a determinação da condição na qual a recuperação foi máxima foi utilizada a função desejabilidade, tendo como objetivo maximizar a resposta.

O programa Statistica®, versão 7 (Statsoft, Tulsa, Estados Unidos) foi utilizado para analisar os dados do delineamento e para gerar os gráficos de superfície de resposta.

3.3.3 Validação do método

A validação é uma etapa imprescindível para avaliar a habilidade do método desenvolvido em fornecer resultados precisos para sua aplicação rotineira (ROZET et al., 2011), pois o bom desempenho de uma técnica analítica depende de dois fatores: da confiabilidade estatística dos cálculos realizados no processamento e da qualidade das medidas instrumentais (RIBEIRO et al., 2008).

O protocolo de validação utilizado foi baseado na Resolução nº 27 de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) e no Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos (*Guideline on bioanalytical method validation)* da European Medicines Agency (EMA, 2011). Foram realizados os estudos de precisão, exatidão, recuperação, seletividade, efeito residual, curva de calibração referente à linearidade e estabilidades: pós-processamento, após ciclos de congelamento e descongelamento, de curta e longa duração e também foi avaliada a estabilidade do analito e do IS em solução.

Para enriquecimento das amostras, foram utilizadas soluções de trabalho em metanol nas concentrações de 1,0 a 250 $\mu g.mL^{-1}$ para o FLU e na concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ para o IS. Em cada tubo de fundo cônico foi realizada a adição de 50 µL das soluções do analito e do IS e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. A seguir, foram adicionados 200 µL de CSF artificial e o tubo foi agitado em vórtex por 5 s. Após a adição da solução de fosfato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração e foram centrifugadas a 2200 *g* por cinco minutos a 4 °C. O solvente extrator foi coletado com o auxílio de uma microsseringa de 250 µL e transferido para outro tubo de fundo cônico e evaporado. Os analitos foram redissolvidos em 150 µL de fase móvel para a realização da análise por HPLC-PDA.

3.3.3.1 Curva de calibração

As curvas de calibração foram construídas contendo seis níveis de concentração (Tabela 7), realizados em quintuplicata (n = 5) no intervalo de concentração de 0,25 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ para o FLU no CSF.

Tabela 7 - Níveis de concentração utilizados para obtenção da curva analítica

Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	Classificação
0,25	LIQ - limite inferior de quantificação
0,50	CB - controle de qualidade de baixa concentração
12,50	-
31,25	CM - controle de qualidade de média concentração
50,00	CA - controle de qualidade de alta concentração
62,50	LSQ - limite superior de quantificação

As curvas foram construídas plotando-se no eixo das abscissas a concentração do FLU no CSF e no eixo das ordenadas a razão entre as áreas do analito e IS. Foram realizados o teste de ajuste do modelo linear e a análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação. Devido à obtenção de resultados insatisfatórios foi necessária a adequação do modelo utilizando-se um modelo de regressão linear ponderado. A adequação do modelo foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), calculando os valores de F e *p*, para um nível de confiança de 95 % e graus de liberdade n–1, por meio do programa Minitab®, versão 18 (Minitab Inc., State College, Estados Unidos).

3.3.3.2 LIQ

Para a determinação do LIQ foram realizadas análises de cinco amostras de CSF artificial submetidas ao procedimento de extração. O LIQ foi calculado baseado em uma curva de calibração no intervalo de concentração de 0,25 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e os resultados foram avaliados através de cálculos de precisão e exatidão.

3.3.3.3 Precisão

A precisão foi determinada em quintuplicata e em cinco níveis de concentração: LIQ, CB, CM, CA e LSQ. Foi avaliada em um mesmo dia (precisão intracorrida) e em três dias diferentes (precisão intercorridas), nas concentrações estabelecidas na Tabela 7.

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 1:

Equação 1:
$$\mathbf{CV} = \frac{\mathbf{DP}}{\mathbf{CMD}} \; \boldsymbol{x} \; \mathbf{100}$$

na qual: DP = estimativa do desvio padrão absoluto
CMD = concentração média determinada.

3.3.3.4 Exatidão

A exatidão também foi determinada em quintuplicata e em cinco níveis de concentração: LIQ, CB, CM, CA e LSQ. Foi avaliada no mesmo dia (exatidão intracorrida) e em três dias diferentes (exatidão intercorridas).

A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), que é a porcentagem de erro em relação à concentração nominal. Para seu cálculo foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e intercorridas e a Equação 2.

Equação 2:

$$\mathbf{EPR} = \frac{\textbf{concentração média experimental} - \textbf{concentração nominal}}{\textbf{concentração nominal}} \; x \; 100$$

3.3.3.5 Efeito residual

Para a avaliação do efeito residual, que se refere ao aparecimento ou aumento do sinal analítico devido à contaminação proveniente de amostras analisadas previamente, foram injetadas três amostras branco, sendo uma antes e duas após a injeção de uma amostra referente ao LSQ (ANVISA, 2012). Os resultados obtidos para as amostras branco foram comparados com os resultados obtidos para o LIQ.

3.3.3.6 Seletividade

O CSF é considerado uma matriz de difícil obtenção, por isso, a seletividade foi avaliada pela determinação da pureza do pico cromatográfico. Para tanto, foram utilizadas amostras de CSF artificial enriquecidas com o IS e o FLU (concentração referente ao LIQ) e duas amostras de um único paciente enriquecidas apenas com o IS. As purezas dos picos obtidos para as amostras do paciente e do CSF artificial foram comparadas com as purezas obtidas para os padrões de referência, para, desta forma, verificar se possíveis componentes endógenos ou fármacos coadministrados podem interferir na análise dos compostos de interesse.

3.3.3.7 Recuperação

Para avaliar a eficiência do processo de extração, foram realizadas extrações em cinco níveis de concentrações (n = 6), contemplando a faixa de linearidade do método. Para tal, a extração foi realizada em conformidade com o que foi descrito no item 3.3.3 e a recuperação foi definida como a razão entre as respostas das replicatas obtidas para as amostras extraídas e as respostas dos analitos em solução.

3.3.3.8 Estudo de estabilidade do fármaco em solução

Neste estudo foram avaliadas soluções armazenadas por 45 dias do analito e do IS para as concentrações referentes ao CB e ao CA. Para isso, uma curva analítica com cinco níveis (n = 3) foi construída. A média dos valores de respostas obtida foi comparada com os valores de média de amostras recém preparadas.

3.3.3.9 Estudos de estabilidade do fármaco em CSF

Estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, de curta duração, longa duração e pós-processamento foram realizados. As três primeiras análises foram realizadas em quadruplicata (n = 4) e a estabilidade pós-processamento foi obtida a partir do uso de sextuplicata (n = 6). Para todos os estudos foram utilizados dois níveis de concentração: CB e CA e a concentração de FLU foi calculada baseada em uma curva de calibração extraída para o intervalo de 0,25 a 62,50 $\mu g.mL^{-1}$.

Os resultados obtidos em cada condição foram comparados com os valores nominais e, para serem consideradas estáveis, as amostras devem ter variação inferior a 15 % em relação ao valor de referência.

❖ **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Nesta etapa foi avaliada a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostras de CSF artificial foram enriquecidas com o padrão de FLU nas concentrações de 0,5 e 50 $\mu g.mL^{-1}$ e foram congeladas a temperatura de -20 ºC por 24 horas. Após este período as amostras foram submetidas ao descongelamento a temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, foram novamente congeladas por pelo menos 12 horas e, assim sucessivamente até contemplar os três ciclos. Após o último ciclo, as amostras foram acrescidas do IS (50 µL da solução de IS na concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$) e submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.3.

❖ **Estabilidade de curta duração**

As amostras foram fortificadas com o FLU nas concentrações de 0,5 e 50 $\mu g.mL^{-1}$ e foram mantidas a temperatura ambiente por 8 horas, tempo suficiente para a realização das extrações de todas as amostras. Após este período, as amostras foram acrescidas de IS e submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.3.

❖ **Estabilidade de longa duração**

A estabilidade de longa duração foi avaliada pelo enriquecimento de amostras de CSF artificial nas concentrações de 0,5 e 50 $\mu g.mL^{-1}$ e manutenção em freezer (-20 °C) por um mês. Após este período as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, o IS foi adicionado e as amostras foram submetidas ao processo de extração descrito no item 3.3.3.

❖ **Estabilidade pós-processamento**

A instabilidade do analito pode ocorrer dependendo do solvente utilizado para sua reconstituição e da temperatura do autoinjetor (CASSIANO et al., 2009). Para avaliar a ocorrência deste fenômeno, seis amostras nas concentrações referentes ao CB e ao CA foram submetidas à extração e analisadas por HPLC. Em seguida, as amostras foram mantidas no autoinjetor a temperatura ambiente e foram reanalisadas ao final da corrida analítica. A concentração de FLU foi determinada por uma curva de calibração no intervalo de concentração de 0,25 a 62,50 $\mu g.mL^{-1}$.

3.3.3.10 Determinação da concentração de FLU em amostra de CSF de paciente em tratamento

A aplicação do método foi realizada pelo uso de duas amostras de CSF de um único paciente, portador de neuromicose, o qual realizou tratamento com o FLU no HCFMRP/USP. Entre os critérios para inclusão estão: o paciente ser adulto e apresentar infecção fúngica do sistema nervoso central e o tratamento incluir o uso do FLU. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Anexo A).

Embora pacientes que não apresentam comprometimento do sistema imune possam apresentar neuromicoses, a grande maioria dos pacientes que apresentam este quadro clínico são portadoras de alguma doença de base como câncer, diabetes, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana ou fazem uso de imunosupressores (MORITA; ISHIHARA; KONNO, 2016). Por isso, como etapa prévia à extração, as amostras foram mantidas por 30 minutos em banho-maria a 56 ºC (SPIRE et al., 1985), protocolo de inativação de possíveis vírus presentes na amostra. Ressalta-se que o FLU mantém-se estável na temperatura utilizada, pois segundo Corrêa et al. (2011) que realizou estudos de estabilidade deste antifúngico em diversas condições de estresse o FLU não se degradou quando mantido em condição de refluxo em solução aquosa a 90 ºC por seis horas.

(WATERSON, 2010a)

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise do FLU por HPLC

3.4.1.1 Seleção das condições analíticas

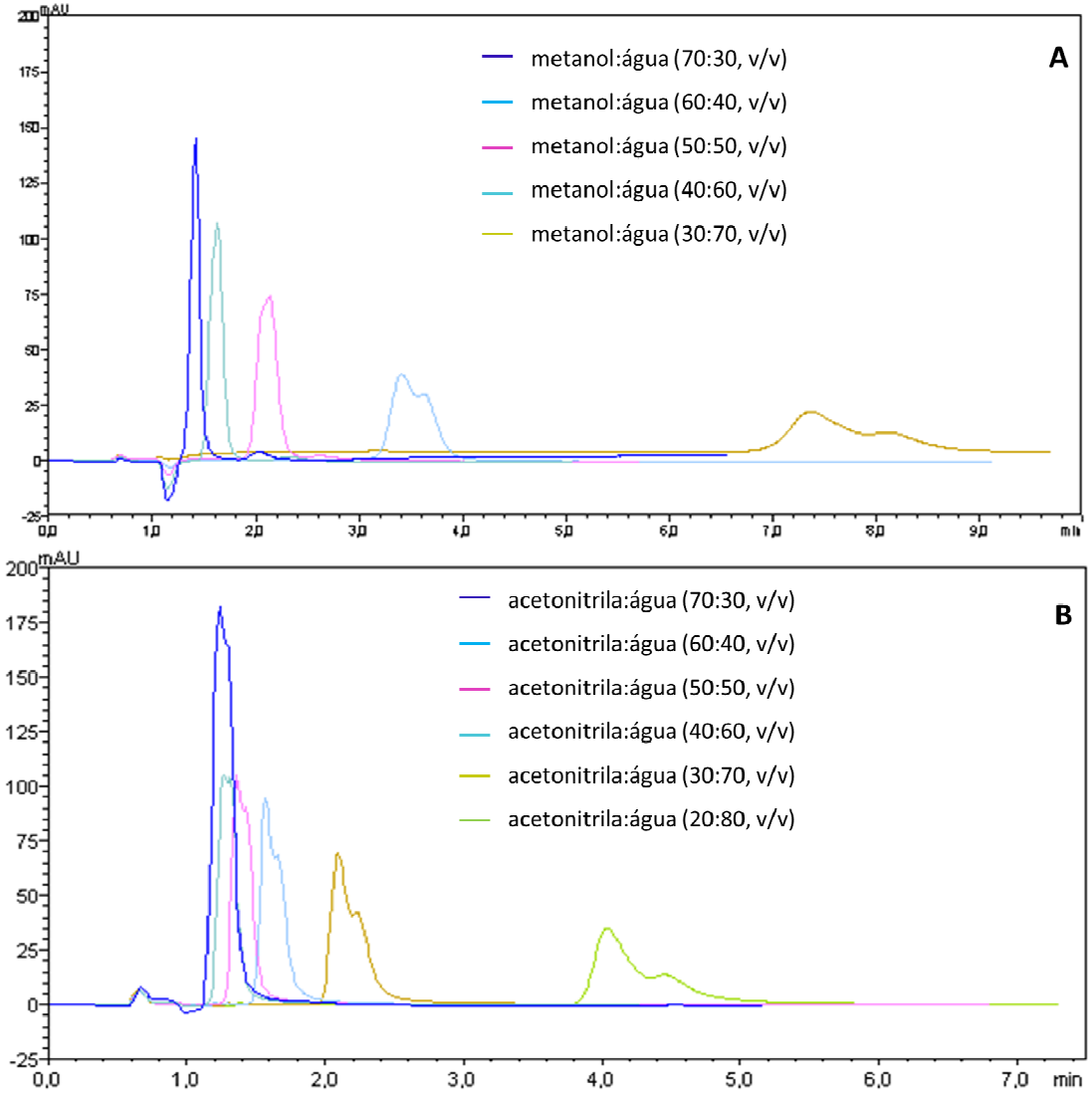
Nos trabalhos de Kurbatova e Kharitonova (2008), Kurbatova, Kharitonova e Finkelshtein (2008) e Kurbatova, Parshikova e Belousova (2008) foram estudadas as retenções de azóis em cromatografia líquida de fase reversa. Segundo Kurbatova, Parshikova e Belousova (2008) compostos derivados de heterociclos de cinco membros são compostos polifuncionais que podem interagir com a fase estacionária e com a fase móvel através de vários sítios de sorção.

Inicialmente, para análise do FLU com a coluna Lichrospher® RP 18, foram avaliados os solventes orgânicos acetonitrila e metanol para composição da fase móvel. Como pode ser observado na Figura 8, os picos apresentaram perfil cromatográfico inadequado, com baixa eficiência e alto valor de assimetria quando o tempo de retenção foi superior a três e dois minutos para as análises utilizando metanol e acetonitrila, respectivamente.

Considerando a necessidade de eluição do FLU em tempo superior a cinco minutos quando se utiliza fluidos biológicos, optou-se por avaliar a adição de aditivos à fase móvel utilizando concentração de metanol de 30 %. Para isso, TFA foi utilizado como modificador da fase móvel nas concentrações de 0,1 % (pH = 2,0) e 0,01 % (pH = 3,0), pois, segundo Guan e Palmer (2006), o TFA possui efeitos sobre a protonação, solvatação e retenção hidrofóbica de compostos básicos e a variação de sua concentração promove mudanças no perfil cromatográfico, com o aumento da retenção dos compostos triazólicos a partir da concentração de 0,05 % de TFA. Embora não tenha sido observada variação significativa no tempo de retenção do FLU com o aumento da concentração de TFA na fase móvel, foi possível observar uma diminuição da assimetria do pico de 2,2 para 1,9 (Figura 9).

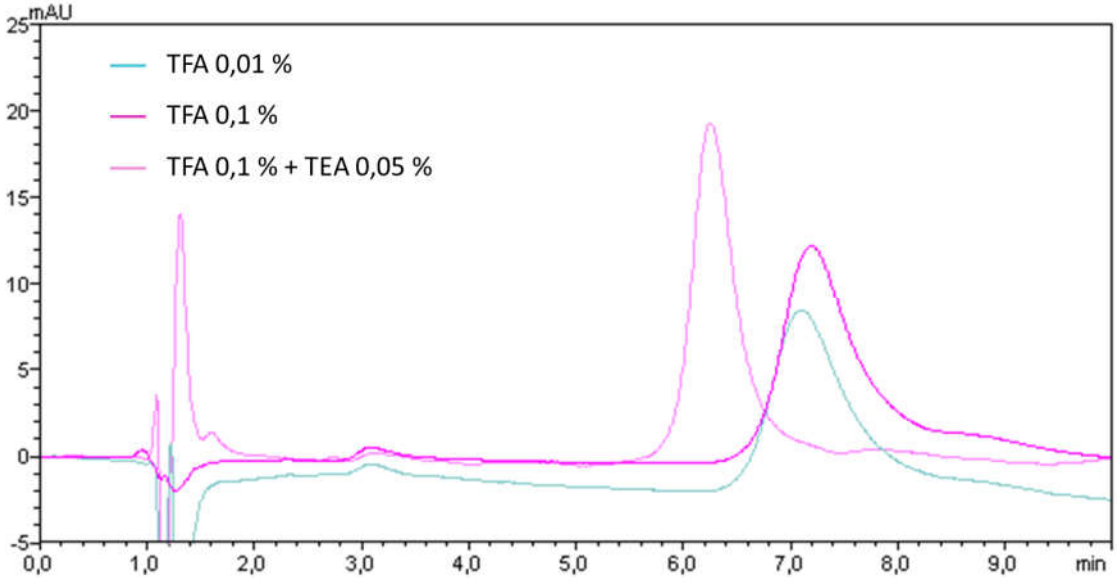
Já a TEA é usada tradicionalmente como aditivo por atuar bloqueando grupos silanóis e reduzir a formação de caudas em picos de analitos básicos (GUAN; PALMER, 2006). Como seu uso pode promover pH acima da faixa de trabalho da coluna, optou-se por utilizar a combinação TEA e TFA nas concentrações de 0,05 % e 0,1 %, que promoveu valor de pH de 2,4. Nesta condição analítica o pico do FLU apresentou tempo de retenção de 6,2 minutos e redução da assimetria para 1,3 (Figura 9).

Figura 8 - Cromatogramas obtidos em estudos realizados com a coluna Lichrospher® RP 18



Condições cromatográficas: coluna Lichrospher® RP 18 (125 mm x 4,6 mm, 5 µm) e coluna de guarda Lichrospher® RP 18 (10 mm x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel: (A) metanol:água; (B) acetonitrila:água. Todas as análises foram realizadas em 210 nm, vazão de 1 mL.min^{-1} e temperatura de 30 ºC.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento descrito no item 3.3.1.1.

Figura 9 - Cromatogramas obtidos nos estudos utilizando aditivos e a coluna Lichrospher® RP 18



Condições cromatográficas: coluna Lichrospher® RP 18 (125 mm x 4,6 mm, 5 µm) e coluna de guarda Lichrospher® RP 18 (10 mm x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel composta por metanol:TFA 0,01 % (30:70, v/v) ; metanol:TFA 0,1 % (30:70, v/v) e metanol:TFA 0,01 % + TEA 0,05 % (30:70, v/v). Todas as análises foram realizadas em 210 nm, vazão de 1 mL.min^{-1} e temperatura de 30 ºC.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento descrito no item 3.3.1.1.

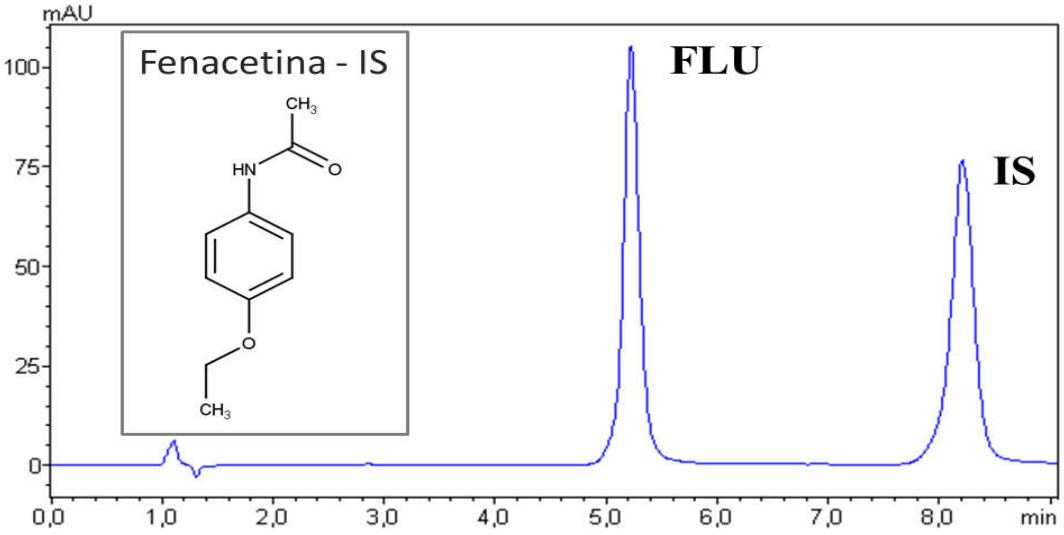
Também foi avaliado o uso da coluna Ascentis® Express C 18, que é superficialmente porosa e possui partículas de menor diâmetro. Os três solventes orgânicos estudados (acetonitrila, etanol e metanol) podem ser empregados para a eluição do FLU, sendo selecionado o etanol devido a sua baixa toxicidade. Contudo, deve-se ressaltar que fazendo uso de mesma força de eluição e temperatura a viscosidade da mistura etanol:água é superior às viscosidades das misturas metanol:água e acetonitrila:água (RIBEIRO et al., 2004), e, por este motivo, optou-se por trabalhar com uma vazão de 0,8 mL.min^{-1}. Portanto, para a análise do FLU, foi determinado o uso de fase móvel contendo 15 % de etanol, temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 mL.min^{-1} e detecção em 210 nm, condição na qual o tempo de retenção do analito foi de 5,1 minutos e a assimetria do pico foi de 1,0.

3.4.1.2 Seleção do IS

Foi selecionada a fenacetina como IS. Este composto possui valor de pKa de 2,1 (BAENA et al., 2004) e já foi utilizado como IS para vários métodos que fizeram a análise do FLU (KOKS et al., 1995; SONG et al., 2015; WATTANANAT; AKARAWUT, 2006; YUAN et al., 2014). A Figura 10 mostra o cromatograma obtido para a condição de análise

estabelecida no item anterior. Observa-se que a fenacetina apresentou tempo de retenção de 8,2 minutos e assimetria de 0,9 e a resolução entre os picos foi de 9,2.

Figura 10 - Cromatograma referente às condições estabelecidas para análise do FLU e do IS



Condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: etanol: água (15:85, v/v), temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 mL.min^{-1} e detecção em 210 nm. Concentração da amostra: 30 µg.mL^{-1} para o FLU e 15 µg.mL^{-1} para a fenacetina.
Fonte: elaborada pelo autor. Cromatograma obtido pelo equipamento descrito no item 3.3.1.1 e estrutura química baseada em Baena et al. (2004).

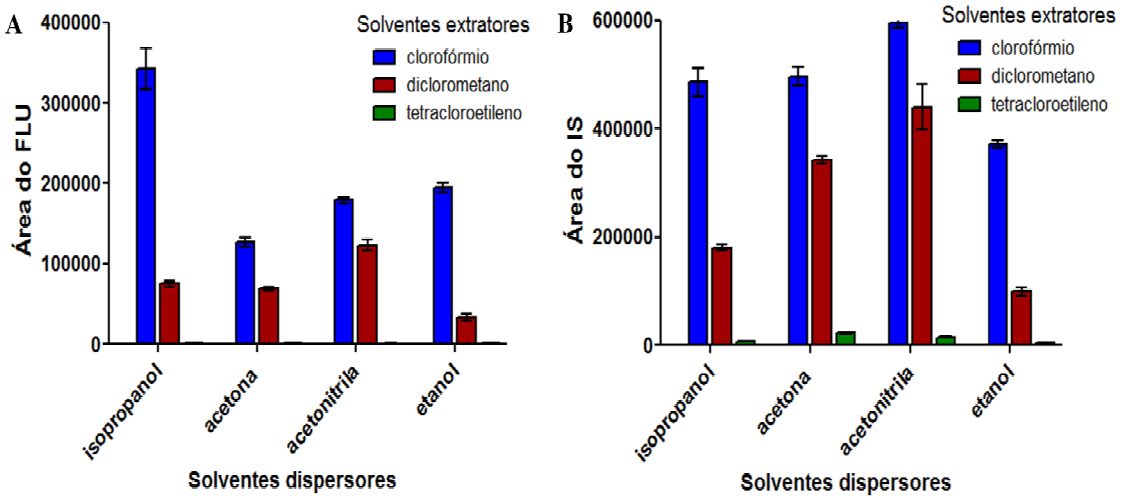
3.4.2 Otimização das condições para extração do FLU de amostras de CSF por DLLME

3.4.2.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor

A seleção destes solventes é de grande importância para a obtenção de uma boa recuperação por DLLME (KOHLER et al., 2013). Foram avaliados o clorofórmio, o diclorometano e o tetracloroetileno como solventes extratores e o isopropanol, a acetona, a acetonitrila e o etanol como solventes dispersores. O clorobenzeno é um solvente de difícil coleta após a centrifugação da amostra e de difícil evaporação, de modo que não foi selecionado como candidato para a extração. Em relação ao tetracloroetileno, quase todo o volume de solvente extrator injetado foi recuperado, embora a recuperação tenha sido muito baixa comparada aos solventes clorofórmio e diclorometano. O diclorometano apresenta alta solubilidade em solução aquosa, sendo assim, o volume recuperado foi baixo, inferior a 40 µL, quando os solventes dispersores foram etanol e isopropanol. Esse fenômeno também foi observado por Cai et al. (2005). A mistura de solvente extrator/dispersor que obteve melhor

recuperação do FLU foi clorofórmio/isopropanol, seguida pela mistura clorofórmio/etanol (Figura 11). O IS teve recuperação superior ao FLU para todas as combinações de solventes.

Figura 11 - Área obtida para o FLU (A) e para o IS (B) durante a seleção dos solventes



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.2.2 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da DLLME

Nos últimos anos houve um grande aumento no uso do delineamento experimental na área biológica. Entre outros trabalhos, podem ser citadas a determinação de fenitoína por DLLME/HPLC em amostras de urina com o auxílio de RSM (POURBASHEER et al., 2014) e a otimização de DLLME/HPLC para análise de melatonina em plasma utilizando FFD e CCD (TALEBIANPOOR et al., 2014). As vantagens observadas sobre os métodos de otimização convencionais são: possibilidade de identificar interações entre as variáveis e, muitas vezes, obter mais informações utilizando um menor número de experimentos (TALEBIANPOOR et al., 2014). Em estudo realizado por Meng et al. (2017), no qual quatro benzodiazepínicos foram quantificados em amostras de urina, a DLLME com solventes de baixa densidade e auxílio de ultrassom foi avaliada de duas formas: através de experimentos nos quais um parâmetro foi avaliado por vez e também pelo delineamento BBD. Foi observada a melhora na eficiência da recuperação quando o delineamento experimental foi utilizado devido a presença de interação entre os fatores tempo de extração, pH da amostra e volume de solvente extrator.

Nesta etapa de identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da DLLME foi selecionado um delineamento fracionário $2^{(7-3)}$ de resolução IV. Os FFD são úteis para as primeiras etapas dos estudos (TALEBIANPOOR et al., 2014) e a resolução do delineamento

escolhido permite que os efeitos principais estejam livres de associações com as interações de primeira e segunda ordem (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; CANDIOTI et al., 2014).

Os valores médios obtidos para a área e recuperação do FLU e do IS e o volume de solvente extrator recuperado estão dispostos na Tabela 8. Os efeitos das variáveis estudadas sobre a área de FLU estão dispostos na Figura 12 na forma de gráfico de Pareto**,** no qual os comprimentos das barras são proporcionais aos valores absolutos dos efeitos padronizados e a linha delimita o valor de *t* crítico (2,02) para um valor de *p* de 0,05. Todos os fatores cujos valores *t* foram superiores ao valor t crítico foram considerados estatisticamente significativos (CAI et al., 2015; TALEBIANPOOR et al., 2014).

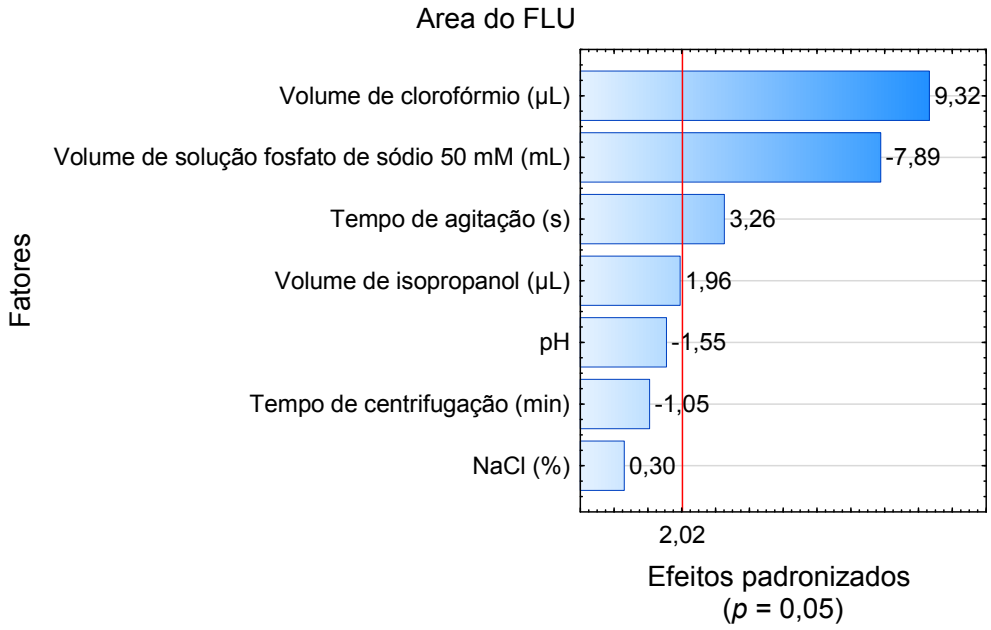
Tabela 8 - Área e recuperação (R) obtidos para o FLU e IS e volume recuperado de solvente extrator para cada condição do FFD (n = 3)

Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)	Área IS ± DP	R IS (%)	Volume recuperado (µL)
1	352398 ± 12128	27	403007 ± 22190	39	84
2	94232 ± 5821	7	134161 ± 6654	13	71
3	120022 ± 1211	9	319837 ± 10566	31	56
4	539199 ± 21960	42	726186 ± 21466	70	76
5	562941 ± 20697	44	623019 ± 33527	60	252
6	125779 ± 7496	10	265608 ± 7333	26	51
7	266157 ± 5751	21	408168 ± 3235	39	75
8	0	0	0	0	0
9	335120 ± 7248	26	628946 ± 18912	61	253
10	846627 ± 8560	66	878616 ± 11797	85	290
11	804197 ± 11915	62	732343 ± 17166	71	298
12	275127 ± 3662	21	279963 ± 3221	27	293
13	442214 ± 4903	34	542082 ± 10024	52	270
14	951673 ± 11229	74	864434 ± 4753	83	690
15	1105314 ± 8568	86	978899 ± 56542	90	753
16	656913 ± 7552	51	808987 ± 27211	78	300

DP - estimativa do desvio padrão absoluto.

O volume de clorofórmio, o volume de solução fosfato de sódio adicionado à amostra e o tempo de agitação foram os três fatores que exerceram efeito significativo sobre a área do FLU, sendo o volume de clorofórmio o de maior influência. O pH da amostra, a concentração de NaCl, o tempo de centrifugação e o volume de isopropanol não tiveram efeitos significativos sobre a quantidade de FLU recuperada durante a extração, de modo que para o teste subsequente, eles não foram considerados. Observa-se que o efeito da adição de solução fosfato tem efeito negativo, de modo que o aumento do volume adicionado à amostra diminui a recuperação do analito, o que pode ser explicado, já que o FLU é um fármaco com log P baixo e tem maior afinidade pela amostra aquosa do que pelo solvente orgânico.

Figura 12 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do FLU. A linha vertical define o nível de confiança de 95 %



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

O pH da amostra é um parâmetro essencial que afeta tanto a eficiência como a seletividade da DLLME (MENG et al., 2011). Os analitos são melhor extraídos pelo solvente orgânico quando estão em sua forma molecular (ZHANG et al., 2012) e como o FLU permaneceu não ionizado em todo o intervalo de pH avaliado (4,0-10,0), o valor de pH não exerceu efeito sobre a extração.

A adição de sal à amostra para a extração foi realizada com o objetivo de verificar se o aumento da força iônica poderia reduzir a solubilidade do analito na fase aquosa e aumentar sua transferência para a fase orgânica (SENA et al., 2017; XIA et al., 2012; ZHANG et al., 2016), aumentando assim, a quantidade recuperada do mesmo no solvente extrator. Este efeito não foi significativo para nenhuma das respostas analisadas, de modo que nenhuma adição de sal foi realizada.

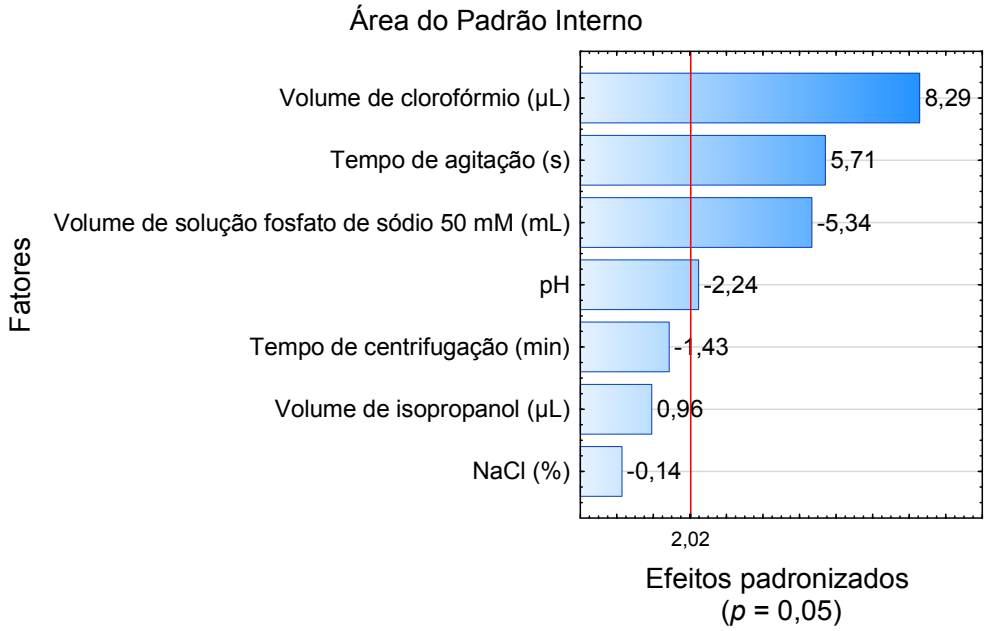
Entre as DLLMEs assistidas, optou-se por avaliar o uso de agitador tipo vórtex, que facilita a transferência de massa dos analitos a partir da amostra aquosa para o solvente extrator, pela formação de gotas finas que aumentam a área de contato (GHAEDI et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Como pode ser visualizado na Figura 12, a agitação promoveu aumento da área do FLU e será melhor avaliada posteriormente.

O tempo de extração da DLLME é o tempo entre a injeção da mistura de solvente e o início da centrifugação. Não foi feita a análise deste fator, pois vários estudos demonstraram

que a extração não é influenciada pelo tempo (AGUIRRE et al., 2015; BERIJANI et al., 2006; SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011; ZAREI; GHOLAMIAN, 2011) e poucos segundos são necessários para a transferência dos analitos para a fase orgânica (FORTES et al., 2013).

Para o IS, além dos fatores que influenciaram na recuperação do FLU, tem-se uma diminuição significativa da recuperação com o aumento do pH (Figura 13). Logo, para a próxima etapa (CCD), foi mantido o uso de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH = 7,3 para a diluição da amostra, já que neste valor o fosfato de sódio está em sua faixa tamponante e o valor de pH não é alto, o que afetaria a extração do IS.

Figura 13 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a área do IS. A linha vertical define o nível de confiança de 95 %



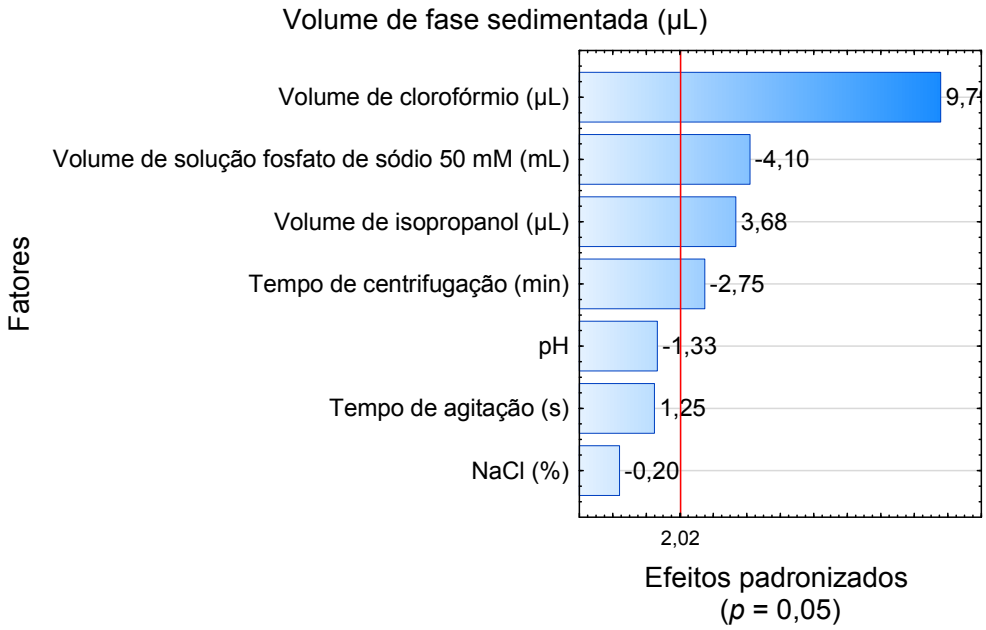
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

O volume de solvente extrator recuperado, também denominado por muitos autores como volume de fase sedimentada está diretamente relacionado com o volume de solvente extrator utilizado. No entanto, ao se observar a Figura 14, pode-se constatar que os volumes de solução fosfato e de isopropanol utilizados e o tempo de centrifugação também afetam o seu valor.

O aumento do volume de solução fosfato adicionado promoveu aumento do volume disponível para solubilização dos solventes extrator e dispersor, de modo que houve uma diminuição no volume de solvente extrator recuperado. O efeito desta variável sobre a resposta foi, portanto, negativo.

Em relação ao volume de isopropanol, quanto maior o volume utilizado maior foi a quantidade de solvente recuperado. Muitas vezes, devido aos baixos valores de volume de amostra e de solução fosfato utilizados, o solvente dispersor não foi suficientemente solubilizado e com a centrifugação foi para o fundo do tubo junto com o solvente extrator, fenômeno também relatado por Lopez-Darias et al. (2010).

Figura 14 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre o volume de fase sedimentada. A linha vertical define o nível de confiança de 95 %



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

3.4.2.3 Seleção da condição ótima de extração

O CCD, que tem sido utilizado em vários trabalhos para a otimização da DLLME (KARIMI et al., 2010; KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; PANAGIOTOU; SAKKAS; ALBANIS, 2009; SERESHTI; KHOJEH; SAMADI, 2011), é o delineamento mais utilizado dentre os de segunda ordem. Além dos níveis do delineamento de primeira ordem, ele apresenta pontos centrais e pontos estrelas, sendo que os pontos centrais permitem a obtenção de rotacionalidade e ortogonalidade e quando replicados podem ser utilizados para o cálculo do erro puro do modelo (TALEBIANPOOR et al., 2014).

Na Tabela 9 estão dispostos os valores médios obtidos para a área e recuperação do FLU e do IS e o volume de solvente extrator recuperado. Observa-se que neste intervalo estudado, a recuperação do FLU chegou a 95 % e do IS a 90 %.

Tabela 9 - Área e recuperação (R) obtidos para o FLU e IS e volume recuperado de solvente extrator para cada condição do CCD (n = 3)

Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)	Área IS ± DP	R IS (%)	Volume recuperado (µL)
1	855278 ± 6229	66	795685 ± 21214	78	230
2	1117498 ± 62295	86	914609 ± 6867	90	473
3	855056 ± 17206	66	811799 ± 31867	80	230
4	1073573 ± 7754	83	907647 ± 10826	90	473
5	256138 ± 8368	20	445897 ± 5577	44	110
6	525544 ± 4129	40	710448 ± 7880	70	287
7	227640 ± 5261	18	419321 ± 15107	41	107
8	520621 ± 2016	40	712411 ± 14700	70	293
9	205998 ± 15897	16	386122 ± 15281	38	39
10	850861 ± 3156	65	870835 ± 11179	86	402
11	629970 ± 8605	48	661572 ± 9531	65	250
12	649530 ± 6178	50	764128 ± 3338	75	220
13	1237611 ± 10183	95	903641 ± 41357	89	700
14	340073 ± 5008	26	554375 ± 2365	55	192
15-20	647557 ± 11371	50	759433 ± 12510	75	224

DP - estimativa do desvio padrão absoluto.

No intervalo analisado, a variável tempo de agitação por aparelho tipo vórtex não exerceu efeito sobre a recuperação do FLU, considerando-se valor de $p < 0,05$ (Tabela 10). Apenas as variáveis volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} e volume de clorofórmio exerceram efeito e não há interação entre estas variáveis.

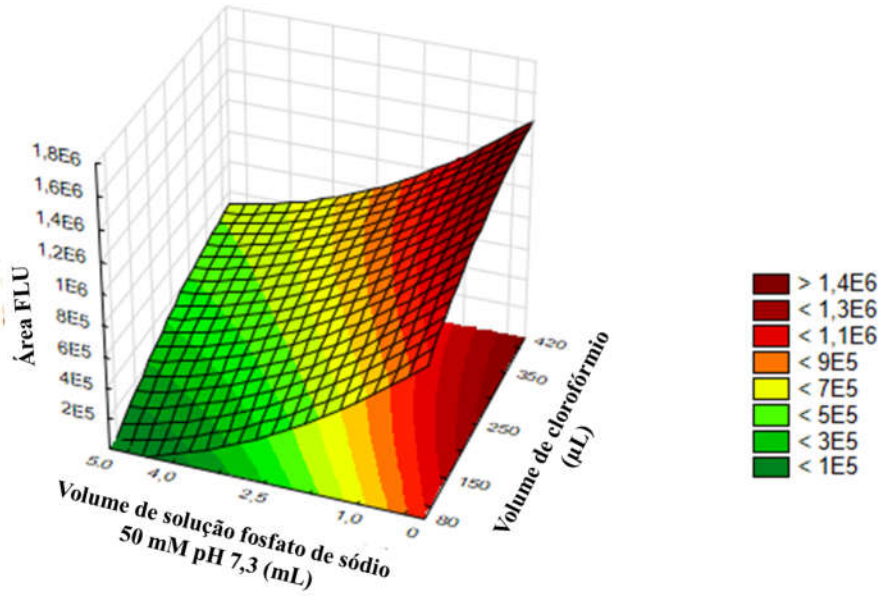
Tabela 10 - Coeficientes do modelo de superfície de resposta para a DLLME

	Coeficientes do FLU	
Efeitos	**Área**	**Recuperação**
x_1 = volume de clorofórmio	151280	11,63
x_3 = volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1}	-286196	-22,01
x_1^2 = volume de clorofórmio^2	-32151	-2,47
x_3^2 = volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L$^{-1\,2}$	56341	4,33

Os efeitos e as interações que não tiveram efeito significativo sobre a área do FLU, com $p > 0,05$ não foram representados.

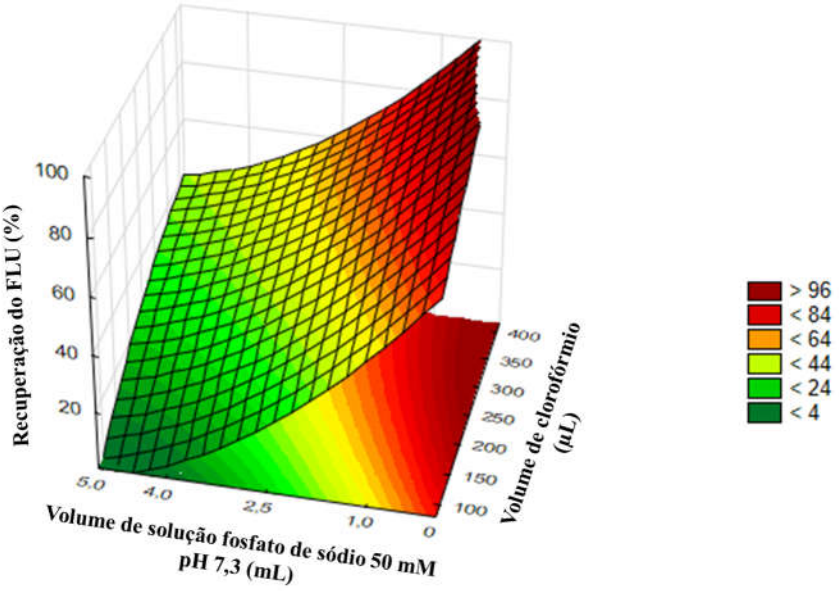
No caso do volume de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} adicionado a amostra, foi observado que quanto maior o volume de solução tampão utilizado, menor foi a área recuperada. Em relação ao volume de clorofórmio utilizado, foi observado que o aumento do volume promoveu aumento da área do FLU, com consequente aumento da recuperação. Nas Figuras 15 e 16 estão ilustrados os gráficos de superfície de resposta obtidos para a área e recuperação do FLU, respectivamente.

Figura 15 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis avaliadas no CCD sobre a área do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Figura 16 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis avaliadas no CCD sobre a recuperação do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

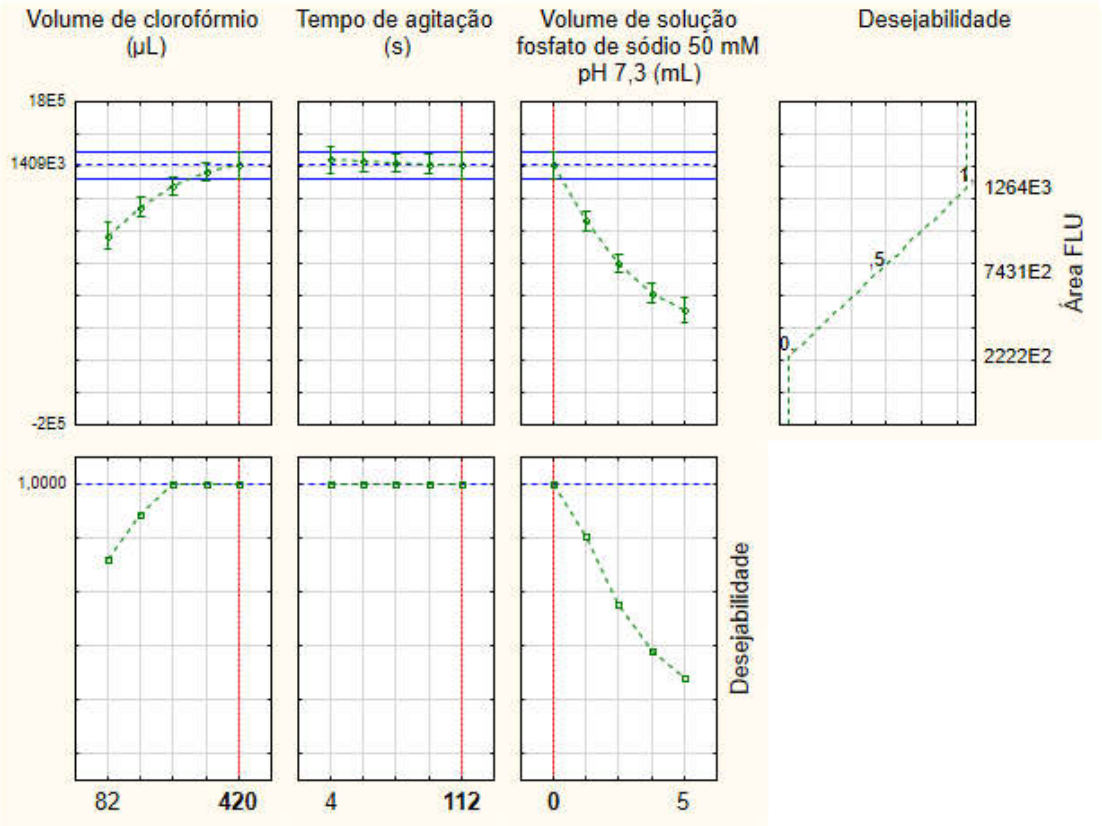
O modelo apresentou valor de F_{calc} igual a 1165,63 e é altamente significativo, pois apresenta valor de F_{calc} muito superior ao $F_{tab(4;55;0,05)} = 2,54$, por isso, mesmo com um valor de falta de ajuste de 15,96 > $F_{tab(10;45;0,05)} = 2,05$, pode ser utilizado para predizer a resposta por meio das equações: área FLU = $647672 + 151280.x_1 - 32151.x_1^2 - 286196.x_3 + 56341.x_3^2$

e Recuperação do FLU = 49,81 + 11,63.x_1 – 2,47.x_1^2 – 22,01.x_3 + 4,33.x_3^2, nas quais x_1 corresponde ao volume de clorofórmio e x_3 ao volume de solução fosfato 50 mmol.L^{-1} pH 7,3. Além disso, tem-se que a equação polinomial do modelo apresenta coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$) igual a 0,987 e, segundo Panagiotou, Sakkas e Albanis (2009) e Talebianpoor et al. (2014) um valor alto desta propriedade indica uma boa relação entre os valores experimentais e o modelo.

Em relação à quantificação, tem-se que o aumento dos valores de área obtidos representa aumento na recuperação do analito, o que é desejável, já que melhora a detectabilidade do método (CASSIANO et al., 2009). O teste de desejabilidade foi realizado tendo como objetivo maximizar a área referente ao pico do FLU. Neste teste, valores de desejabilidade próximos a 1,0 refletem que os valores da variável dependente encontram-se próximos aos valores considerados como ótimos pelo experimentador e valores próximos a zero correspondem a situações experimentais não desejáveis (TALEBIANPOOR et al., 2014).

A condição composta por 420 µL de clorofórmio, 0 mL de solução de fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1}, 112 s de agitação fornece uma recuperação de cerca de 97 % e apresentou D_{total} = 1,0 (Figura 17). Porém, esta condição utiliza um alto volume de solvente extrator em relação ao volume de amostra e a ausência de solução fosfato impossibilita a padronização do pH para a extração e dificulta a formação do ponto nuvem, de modo que observando os gráficos obtidos (Figuras 15 e 16), optou-se por utilizar volume de 100 µL de clorofórmio, 100 µL de isopropanol, 200 µL de solução fosfato de sódio e 200 µL de líquor artificial. Nesta condição de extração, descrita na Tabela 11, foram obtidas recuperações de 72 % para o FLU e de 81 % para o IS, as quais representaram um aumento da recuperação dos analitos de cerca de 2,6 vezes para o FLU e de 1,5 vezes para o IS em relação a condição inicial de extração utilizada.

Figura 17 - Gráfico de desejabilidade para a área do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Tabela 11 - Condições estabelecidas para a análise do FLU em amostras de CSF

	Condições estabelecidas	
DLLME	IS [50 µg.mL^{-1}] - volume	fenacetina - 50 µL
	Volume de amostra biológica	200 µL
	Solvente extrator e volume	clorofórmio - 100 µL
	Solvente dispersor e volume	isopropanol - 100 µL
	Solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH = 7,3	200 µL
	Centrifugação	2200 *g* por 5 min a 4 ºC
	Volume final da amostra	150 µL
HPLC	Coluna	Ascentis® Express C 18
	Temperatura	45 ºC
	Vazão	0,8 mL.min^{-1}
	Fase móvel (proporção v/v)	Etanol:água (15:85)
	Volume de injeção	25 µL
	Comprimento de onda	210 nm

3.4.3 Validação do método

3.4.3.1 Curva de calibração

A curva de calibração deve ser construída e avaliada pela análise de amostras extraídas da matriz em pelo menos seis níveis de concentração (ANVISA, 2012). Dentro dos modelos matemáticos para a representação da relação entre a resposta do instrumento e a concentração do analito o modelo linear é preferencialmente escolhido e a linearidade para uma determinada faixa de concentração representa a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância (ANVISA, 2012; GUILHEN et al., 2010; RIBANI et al., 2004).

As curvas analíticas foram construídas utilizando-se seis níveis de concentração e plotando no eixo das abscissas a concentração do FLU na matriz e no eixo das ordenadas a razão entre as áreas do analito e do padrão interno. O intervalo de 0,25 a 62,50 $\mu g.mL^{-1}$ foi estabelecido para garantir a quantificação do FLU mesmo para pacientes que fazem uso de altas doses, uma vez que concentrações médias de 51,8 $\mu g.mL^{-1}$ foram observadas no plasma no estado de equilíbrio para pacientes fazendo uso de FLU na dose diária de 1200 mg (ANAISSIE et al., 1995).

Embora a reta apresente coeficiente de correlação adequado (r = 0,99) o modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados não foi adequado para a faixa de concentração estabelecida, o que pode ocorrer segundo Cassiano et al. (2009). Em intervalos de concentração de mais de uma ordem de magnitude, devem ser esperadas diferenças entre as variâncias para cada valor de concentração e grandes variações nas concentrações maiores tendem a influenciar a regressão mais que as pequenas variações presentes nas menores concentrações (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Sendo assim, optou-se por utilizar um modelo de regressão ponderada. Foram avaliados os modelos com pesos 1/x, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, 1/y, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$, como mostra a Tabela 12.

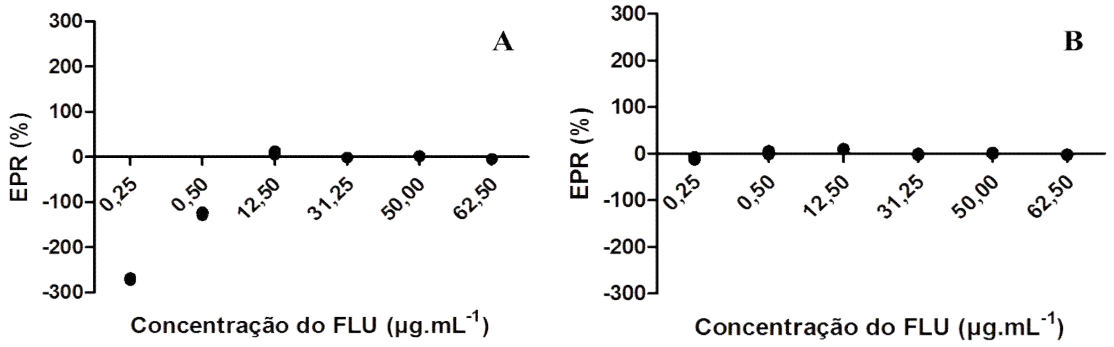
Tabela 12 - Parâmetros das curvas de calibração e soma dos EPRs para os pesos de ponderação avaliados (n = 30)

Peso	Coeficiente linear (b)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente de correlação (r)	Σ EPR (%)[a]
1[b]	0,0178	0,0271	0,9988	-1940,01
1/x	0,0006	0,0282	0,9996	0
$1/x^2$	-0,0001	0,0289	0,9991	0
$1/x^{1/2}$	0,0042	0,0275	0,9991	-324,25
1/y	0,0006	0,0282	0,9997	7,74
$1/y^2$	-0,0001	0,0288	0,9993	14,05
$1/y^{1/2}$	0,0041	0,0275	0,9991	-314,13

[a] Σ EPR (%) - soma das exatidões de todas as análises realizadas para a curva de calibração, expressa em porcentagem
[b] regressão linear pelo método dos mínimos quadrados não ponderada

A soma dos EPR é um bom indicador da qualidade da ponderação (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Os menores valores para a Σ EPR obtidos estão relacionados com os modelos de peso 1/x e $1/x^2$, que conforme descrito por Peters, Drummer e Musshoff (2007) são os dois modelos que normalmente compensam a heterocedasticidade apresentada no modelo não ponderado. Desta forma, levando em consideração a simplicidade do modelo e os valores do coeficiente de correlação, foi adotado o ajuste da regressão linear com peso 1/x. Os valores da Σ EPR (%) para o modelo de regressão linear não ponderado apresentou alto valor, pois os valores de EPR para as duas menores concentrações analisadas foram superiores a 100 %. Por sua vez, para o modelo de regressão linear ponderado adotado, os valores de ERP obtidos foram inferiores aos valores recomendados pela ANVISA (2012) e pelo EMA (2011) (Figura 18).

Figura 18 - Porcentagem de erro padrão relativo versus concentração de FLU para (A) modelo de regressão linear não ponderado e (B) modelo de regressão ponderado com peso 1/x



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism 5.

A análise de variância do modelo (ANOVA) apresentou valor de F_{calc} muito superior ao $F_{tab(1;28;0,05)} = 4,2$ e valor de $p < 0,05$ (Tabela 13), estando estas informações relacionadas com a rejeição da hipótese nula, ou seja, o modelo de regressão ponderado com peso 1/x é aceito. O valor de falta de ajuste não pode ser calculado uma vez que é obtido a partir do valor da soma dos resíduos, que neste caso, é muito baixa ($2,3.10^{-13}$).

Tabela 13 - ANOVA para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado, com nível de significância $p = 0,05$

	Soma quadrática	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**F_{calc}**	**F_{tab}**	**Valor de *p***
Regressão	30,56	1	30,56	74032274,25	4,20	0,00
Resíduos	0,00	28	0,00	-	-	-

3.4.3.2 LIQ

O LIQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com confiabilidade adequada, ou seja, com precisão e exatidão apropriadas (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007; UHROVCIK, 2014). Para avaliar o LIQ foram analisadas, em quintuplicata, amostras de CSF fortificadas nas concentrações de 0,25 $\mu g.mL^{-1}$. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 14 e são inferiores aos limites estabelecidos para métodos bioanalíticos, que admite valores de LIQ com exatidão e precisão inferiores a 20 % (ANVISA, 2012).

Tabela 14 - LIQ do método para a análise do FLU em CSF

	FLU
Concentração nominal ($\mu g.mL^{-1}$)	0,25
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)[a]	0,22
Precisão (CV, %)[b]	3,9
Exatidão (EPR, %)[c]	-10,3

[a] n = 5, n = número de replicatas
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

3.4.3.3 Precisão

A precisão é um parâmetro importante que permite decidir se o método analítico é confiável para o objetivo da análise (CASSIANO et al., 2009), pois avalia a proximidade dos resultados obtidos entre as medidas de amostras de mesma concentração (PAI; DUBHASHI, 2010).

A precisão intracorrida foi realizada para cinco níveis de concentração em quintuplicata e a precisão intercorridas foi avaliada pela realização de quintuplicatas das concentrações avaliadas em três dias diferentes. A Tabela 15 mostra os valores obtidos, os quais se mantiveram dentro dos critérios recomendados na literatura (CV < 15 %), tanto para a precisão intracorrida como para a precisão intercorridas (ANVISA, 2012).

Tabela 15 - Precisão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em CSF

	Dia	**FLU**				
Concentração nominal ($\mu g.mL^{-1}$)		**0,25**	**0,50**	**31,25**	**50,00**	**62,50**
INTRACORRIDA						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)	Dia 1	0,23	0,51	31,59	51,34	59,98
	Dia 2	0,22	0,51	31,17	51,12	59,85
	Dia 3	0,22	0,51	30,82	50,55	61,14
Precisão (CV, %)[a]	Dia 1	4,2	2,2	0,3	2,5	1,0
	Dia 2	2,4	2,7	0,7	1,2	0,7
	Dia 3	3,3	3,4	1,8	1,5	1,2
INTERCORRIDAS						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)		0,22	0,51	31,19	51,00	60,32
Precisão (CV, %)[a]		3,9	2,6	1,5	1,8	1,4

[a] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

3.4.3.4 Exatidão

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados e os valores de referência também chamados de nominais (CASSIANO et al., 2009). Para o cálculo da exatidão foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos. Para a exatidão intracorrida a média foi obtida de cinco amostras e nos estudos intercorridas a partir de quintuplicatas de três dias, totalizando quinze amostras. Na Tabela 16 estão dispostos os valores obtidos, sendo que os resultados estão de acordo com os critérios definidos pela resolução adotada para a validação do método (ANVISA, 2012).

Tabela 16 - Exatidão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em CSF

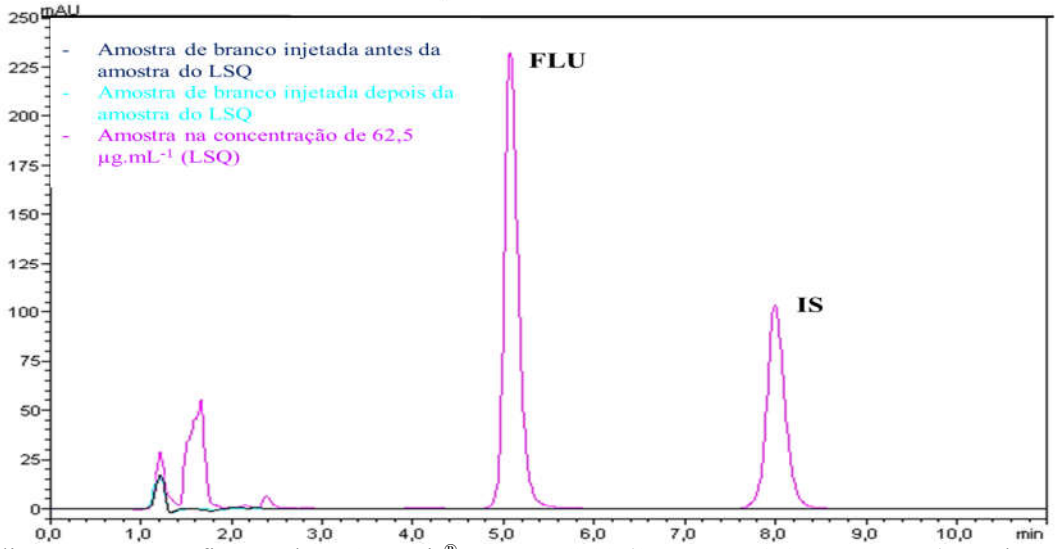
	Dia	**FLU**				
Concentração nominal ($\mu g.mL^{-1}$)		**0,25**	**0,50**	**31,25**	**50,00**	**62,50**
INTRACORRIDA						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)	Dia 1	0,23	0,51	31,59	51,34	59,98
	Dia 2	0,22	0,51	31,17	51,12	59,85
	Dia 3	0,22	0,51	30,82	50,55	61,14
EPR (%)[a]	Dia 1	-8,1	1,6	1,1	2,7	-4,0
	Dia 2	-12,8	2,0	-0,3	2,2	-4,2
	Dia 3	-10,1	2,5	-1,4	1,1	-2,2
INTERCORRIDAS						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)		0,22	0,51	31,19	51,00	60,32
EPR (%)[a]		-10,3	2,0	-0,2	2,0	-3,5

[a]EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

3.4.3.5 Efeito residual

Como pode ser visto na Figura 19, as amostras injetadas de branco de CSF antes e após o LSQ não apresentaram interferentes referentes a uma possível contaminação proveniente da amostra anteriormente analisada, de modo que não foi constatado efeito residual para o método desenvolvido.

Figura 19 - Cromatogramas das amostras de branco de CSF e da amostra referente ao LSQ



Condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: etanol: água (15:85, v/v), temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$ e detecção em 210 nm.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.3.1.1.

3.4.3.6 Seletividade

A seletividade é definida como a habilidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de outros componentes como impurezas, metabólitos, produtos de degradação e outros compostos que possam estar presentes na matriz (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007; ROZET et al., 2011).

Infelizmente não foi possível avaliar a seletividade utilizando fontes distintas da matriz biológica devido à dificuldade de obtenção do CSF. A análise da seletividade em relação aos fármacos coadministrados também não foi passível de realização, pois a quantidade de fármacos administrados a estes pacientes é alta e o tratamento pode incluir o uso de antirretrovirais, anticonvulsivantes, anticoagulantes, antitérmicos, sendo muitos destes fármacos de custo elevado ou venda controlada, o que torna inviável sua aquisição para os testes.

Assim, para confirmar que o método desenvolvido apresentou seletividade para o objetivo proposto, as purezas dos picos cromatográficos do FLU e do IS para as amostras extraídas de CSF artificial e de CSF de paciente foram comparadas com a pureza do padrão de referência. Os índices de pureza apresentaram valores próximos a um (Tabela 17), o que indica que nenhum interferente co-eluiu junto com o analito de interesse.

Tabela 17 - Índice de pureza cromatográfica referente ao FLU e ao IS

Tipo de amostra	Índice de pureza do pico do FLU	Índice de pureza do pico do IS
Padrão de referência	0,999993	0,999987
Amostra de CSF fortificada com solução padrão	0,999995	0,999987
Amostras de CSF de pacientes (n = 2)	0,999993	0,999986

3.4.3.7 Recuperação

Não há um valor de aceitação imposto para este parâmetro. De modo geral, se aceita recuperações baixas se estas forem suficientes para a detecção e ou quantificação das menores concentrações estabelecidas para o método (HARTMANN et al., 1998). Neste caso, temos que, para n = 30, compreendendo todos os níveis de concentração, a recuperação média do FLU foi de 70 % (CV = 9 %) e a recuperação média do IS foi de 81 %, (CV = 5 %).

3.4.3.8 Estudo de estabilidade do fármaco em solução

Foi observado que o FLU e o IS permaneceram estáveis pelo período de 45 dias quando armazenados em solução metanólica (Tabela 18), pois foram obtidos desvios

inferiores a 5 % das respostas das amostras armazenadas por 45 dias em relação as amostras recém preparadas e o limite estabelecido pelo guia utilizado neste estudo é de 10 % (ANVISA, 2012).

Tabela 18 - Estabilidade do FLU em solução metanólica

	Concentração nominal (µg.mL^{-1})	**0,5**	**50**
Estudo de estabilidade em solução[a]	Concentração obtida de amostras frescas (µg.mL^{-1})	0,48	44,94
	Concentração obtida de amostras de 45 dias de armazenamento (µg.mL^{-1}) [a]	0,47	42,93
	Precisão - CV [b] (%)	10,0	4,6
	Exatidão - EPR (%) [c]	-5,3	-14,1
	Desvio da amostra armazenada em relação à amostra fresca (%)	-1,3	-4,5

[a] n = 3, n = número de replicatas
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

3.4.3.9 Estudos de estabilidade do fármaco em CSF

A estabilidade do fármaco em fluidos biológicos é uma questão crítica na validação de métodos bioanaliticos (MOEIN; EL MEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017), já que é um pré-requisito para uma quantificação fidedigna (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007). Por isso, as condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (ANVISA, 2012) e a estabilidade determinada para um tipo de amostra biológica e de material de acondicionamento não pode ser extrapolada para outros (FDA, 2001).

❖ **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Considerando-se que pode haver necessidade de refazer a análise de alguma amostra, a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento deve ser avaliada, e para isso são realizados três ciclos de congelamento e descongelamento, mantendo as amostras congeladas por um período superior a 12 horas entre os ciclos. As amostras foram submetidas ao processo de extração e as concentrações obtidas foram analisadas em relação ao valor nominal. Conforme os dados demonstrados na Tabela 19, pode-se observar que as amostras mantiveram-se estáveis, já que a variação foi inferior ao valor de ± 15 % (ANVISA, 2012; EMA, 2011).

Tabela 19 - Estabilidade do FLU em CSF após ciclos de congelamento e descongelamento

	Concentração nominal (µg.mL^{-1})	**0,5**	**50**
Ciclo de congelamento e descongelamento[a]	Concentração obtida (µg.mL^{-1})	0,53	50,36
	Precisão - CV (%)[b]	6,7	1,2
	Exatidão - EPR (%)[c]	6,4	0,7

[a] n = 4, n = número de replicatas de amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

❖ **Estabilidade de curta duração**

A estabilidade do analito em matrizes biológicas é geralmente crítica, mesmo para curtos períodos de tempo (HARTMANN et al., 1998) e, portanto, é importante realizar a avaliação da estabilidade de curta duração dos compostos na matriz. Como pode ser visualizado na Tabela 20, não foi observada a degradação dos analitos.

Tabela 20 - Estabilidade de curta duração do FLU em amostras de CSF

	Concentração nominal (µg.mL^{-1})	**0,5**	**50**
Estabilidade de curta duração[a]	Concentração obtida (µg.mL^{-1})	0,48	49,98
	Precisão - CV (%)[b]	4,5	1,4
	Exatidão - EPR (%)[c]	-4,2	0,0

[a] n = 4, n = número de replicatas das amostras submetidas ao estudo de estabilidade de curta duração
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

❖ **Estabilidade de longa duração**

A estabilidade de longa duração deve ser estabelecida, pois quando o material biológico é armazenado por longos períodos de tempo pode ocorrer a degradação dos compostos de interesse (CASSIANO et al., 2009; HARTMANN et al., 1998). Neste estudo, amostras fortificadas foram mantidas em freezer por um período de 30 dias e acrescidas de IS antes da extração. As concentrações obtidas apresentaram-se dentro do intervalo estabelecido pelos guias utilizados neste estudo (Tabela 21).

Tabela 21 - Estabilidade de longa duração para o FLU em amostras de CSF

	Concentração nominal (μg.mL^{-1})	0,5	50
Estabilidade de longa duração[a]	Concentração obtida (μg.mL^{-1})	0,48	46,79
	Precisão - CV (%)[b]	1,8	1,7
	Exatidão - EPR (%)[c]	-3,9	-6,4

[a] n = 4, n = número de replicatas das amostras avaliadas no estudo de estabilidade de longa duração
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

❖ **Estabilidade de pós-processamento**

Este parâmetro foi avaliado realizando-se a comparação das concentrações obtidas para amostras injetadas logo após seu preparo com os valores obtidos após permanência no equipamento por período suficiente para a análise de todas as amostras. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 22 e demonstram que as amostras são estáveis pelo período de tempo suficiente para a realização das análises diárias.

Tabela 22 - Estabilidade do FLU pós-processamento

	Concentração nominal (μg.mL^{-1})	0,5	50
Estabilidade pós-processamento[a]	Concentração obtida (μg.mL^{-1})	0,53	51,62
	Precisão - CV (%)[b]	3,8	2,8
	Exatidão - EPR (%)[c]	6,2	3,2

[a] n = 6, n = número de replicatas das amostras avaliadas após 12 horas do processamento
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

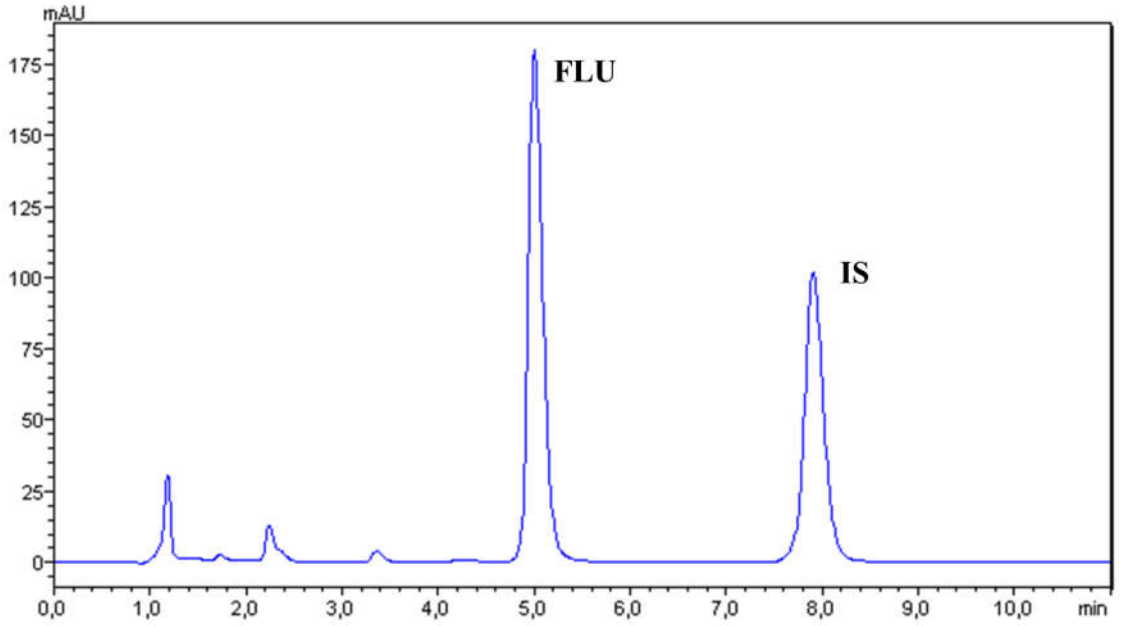
3.4.3.10 Determinação da concentração de FLU em amostra de CSF de paciente em tratamento com o FLU

O FLU foi avaliado em duas amostras de CSF de um único paciente coletadas com um intervalo de sete dias entre elas. As concentrações obtidas foram de 45,29 μg.mL^{-1} (Figura 20) e 41,71 μg.mL^{-1}.

Comparando o método desenvolvido com os descritos na literatura para análise do FLU em CSF que também fazem uso do HPLC para quantificação, tem-se uma expressiva redução na quantidade de amostra necessária. Além disso, embora o LIQ obtido não supere o valor obtido por Wallace et al. (1992), a técnica de microextração permitiu o uso de apenas 200 μL de solvente orgânico (solvente extrator e solvente dispersor), enquanto as extrações utilizando a LLE e a SPE já relatadas na Tabela 1 necessitaram um volume entre 2 e 3 mL. Desta forma, considerando os doze princípios da química analítica verde (GALUSKA;

MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013), este método utilizando DLLME/HPLC-PDA atende aos itens: utilização de delineamentos experimentais, redução do volume de amostra e de reagentes, o que promove redução do risco operacional e ambiental e promoção do uso de solvente obtido de fonte renovável pela utilização do etanol na fase móvel. Além disso, pode ser facilmente aplicado em uma rotina de monitoramento terapêutico, devido à sua simplicidade e baixo custo.

Figura 20 - Cromatograma referente à análise de uma amostra de paciente em tratamento com o FLU



Condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: etanol:água (15:85, v/v), temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$ e detecção em 210 nm.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.3.1.1.

(WATERSON, 2009a)

3.5 CONCLUSÕES

3.5 CONCLUSÕES

Este estudo desenvolveu e validou um método para a quantificação do FLU em amostras de CSF, utilizando a DLLME associada à técnica de HPLC-PDA.

Foi possível analisar o FLU e o IS em tempo inferior a 10 minutos com resolução superior a nove entre os picos. Além disso, o método desenvolvido fez uso de etanol, solvente orgânico de baixa toxicidade.

A microextração selecionada fez uso de pequena quantidade de solventes extrator e dispersor (100 μL de cada) e obteve recuperação média para o FLU de 70 % e de 81 % para a fenacetina utilizando volume de amostra inferior ao comumente utilizado para as técnicas de extração convencionais. Ademais, o uso do delineamento experimental para a otimização dos parâmetros que influenciam a microextração selecionada possibilitou um estudo mais extenso da influência das variáveis no processo de extração e por fim, a validação do método encontra-se em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (2012) e pelo EMA (2011) e possibilitou a análise de amostras de paciente, pois apresentou ampla faixa de linearidade (0,25 a 62,50 $\mu g.mL^{-1}$).

Em relação aos métodos descritos na literatura que utilizam a técnica de HPLC-UV para análise do FLU em CSF, o método desenvolvido utilizou menores volumes de solventes orgânicos na etapa de extração do analito, utilizou solvente de menor toxicidade para composição da fase móvel e atendeu a vários princípios da química analítica verde. Ademais o processo de otimização da extração por meio dos delineamentos promoveu aumento da recuperação do FLU de cerca de 2,6 vezes em relação a condição inicial.

Conclui-se que foi desenvolvido um método rápido, seletivo, de baixo custo e fácil execução para a quantificação do antifúngico fluconazol em amostras de líquor através do uso de uma técnica de microextração não explorada, até o momento, para esta finalidade.

(WATERSON, 2007)

4 CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de um método para análise do fluconazol em amostras de plasma por HF-LPME/HPLC-PDA

(WATERSON, 2010a)

4.1 INTRODUÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 HF-LPME

A miniaturização da extração líquido-líquido foi primeiramente realizada em 1996 por Jeannot e Cantwell e baseou-se no uso de uma gota de solvente orgânico suspensa na ponta de uma agulha de microsseringa, sendo chamada de SDME (DE OLIVEIRA et al., 2008; JEANNOT; CANTWELL, 1996; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). Como desvantagens desta microextração estão a instabilidade da gota (SPIETELUN et al., 2014) e a necessidade de pré-tratamento de amostras contendo material particulado ou bastante viscosas (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Por isso, para aprimorar as técnicas de microextração com solventes, em 1999 Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, com a ajuda de fibras ocas de paredes porosas de polipropileno, desenvolveram a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME ou LPME) (FOTOUHI et al., 2011; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999), a qual pode ser executada em duas configurações principais: configuração do tipo haste (*rod-like*), na qual uma única microsseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora e configuração em "U", mais utilizada e que é realizada com duas microsseringas conectadas à fibra (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Na HF-LPME o volume de amostra varia de 100 μL a 4 mL e o tamanho da fibra normalmente utilizado é de 1,5 a 8 cm. Em etapa prévia à extração, a fibra é embebida em solvente orgânico de baixa volatilidade e imiscível em água para a imobilização deste em sua parede e o excesso é removido pela imersão da fibra em água com o auxílio de ultrassom. Este processo é importante por promover a formação de uma fina camada de solvente, normalmente de espessura de 200 μm e volume de 15-20 μL entre as fases doadora e aceptora. Assim, completado este passo, o lúmen da fibra é preenchido com a solução aceptora através de uma microsseringa e a fibra é colocada dentro de um frasco contendo a amostra (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

A técnica descrita é baseada no equilíbrio (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008) e necessita da otimização de alguns parâmetros durante o desenvolvimento do método como: velocidade de agitação, força iônica da amostra, volumes de fase doadora e aceptora, tempo de extração, pH da amostra e da fase aceptora (no sistema de três fases) e seleção adequada do solvente orgânico para a impregnação da fibra (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; TAHMASEBI; YAMINI; SALEH, 2009).

Entre as vantagens desta técnica estão: uso único da fibra, o que evita problemas de

carregamento de amostra ou de contaminação cruzada (BEN-HANDER et al., 2015; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001), baixo consumo de solvente orgânico, ótima remoção dos interferentes da amostra, pois o tamanho dos poros garante a ocorrência de microfiltração (BEN-HANDER et al., 2015; FERNANDEZ et al., 2015; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; ZHOU et al., 2012), especialmente útil para a análise de amostras complexas (BELLO-LOPEZ et al., 2012; CUI et al., 2012) e alto fator de enriquecimento (EF) (LEE et al., 2008), que pode ser determinado pela recuperação (R), expressa em porcentagem, pelo volume de fase doadora (V_D) e volume de fase aceptora (V_A) (GJELSTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2013; PIROOZI et al., 2014), de acordo com a Equação 3:

Equação 3:
$$\mathbf{EF} = \frac{\mathbf{R\,(\%)}\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{V_D}}{\mathbf{100}\quad \boldsymbol{x}\ \mathbf{V_A}}$$

A principal desvantagem da HF-LPME é o tempo relativamente longo de extração (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008), sendo necessário um intervalo entre 30 e 45 minutos para garantir o equilíbrio para a maioria das aplicações. Contudo, este inconveniente pode ser superado pela agitação simultânea de um grande número de amostras (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

4.1.2 Classificação da HF-LPME

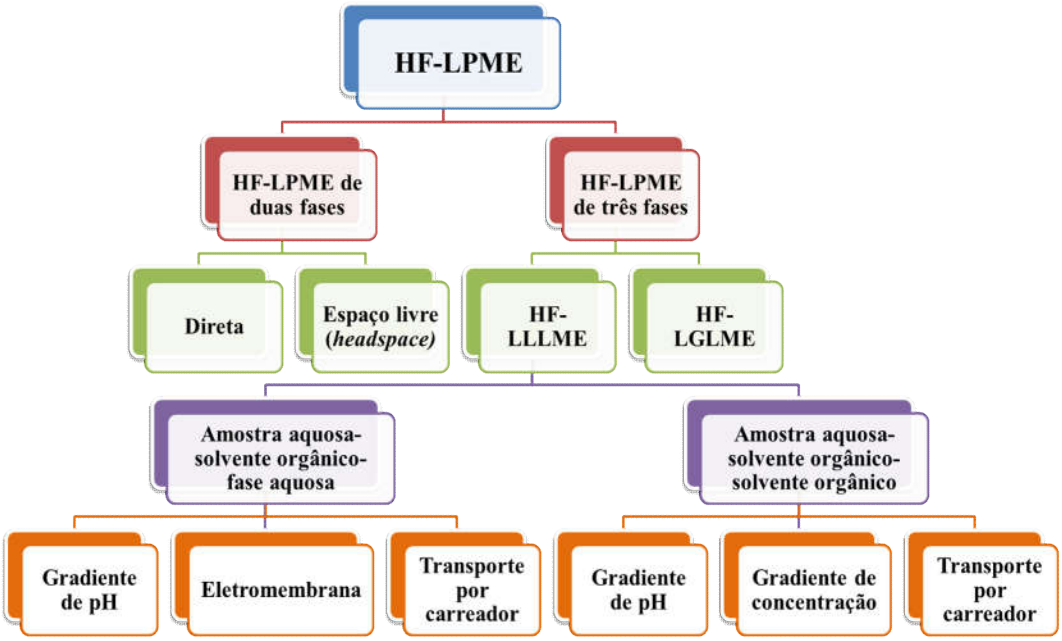
A HF-LPME pode ser realizada em sistemas de duas ou três fases (Figura 21) (DE OLIVEIRA et al., 2008; ZARGAR; HATAMIE, 2014). No sistema de duas fases, adequado para compostos não polares, os analitos são extraídos a partir da amostra aquosa para um solvente orgânico presente tanto na parede quanto no lúmen da fibra oca (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; ZARGAR; HATAMIE, 2014). A extração, neste caso, pode ocorrer pelo contato direto da fibra com a amostra ou pela colocação da fibra no espaço livre (*headspace*) para a extração de compostos voláteis (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012; HANSSON; NILSSON, 2009) e pode ser representada pela Equação 4, na qual A representa o analito. O coeficiente de distribuição (D) de A entre as fases é determinado pela fórmula descrita na Equação 5, sendo $C_{eq\ fase\ aceptora}$ a concentração no estado de equilíbrio do analito na fase aceptora, $C_{eq\ fase\ doadora}$ a concentração no estado de equilíbrio do analito na fase doadora, $K_{(fase\ aceptora/fase\ doadora)}$ o coeficiente de partição entre as fases e α_D a

fração passível de extração da concentração total do analito na fase doadora, ou seja, a fração não ionizada (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

Equação 4 : $$A_{(\text{fase doadora})} \rightleftharpoons A_{(\text{fase aceptora})}$$

Equação 5: $$D_{(\text{fase aceptora/fase doadora})} = \frac{C_{\text{eq fase aceptora}}}{C_{\text{eq fase doadora}}} = \alpha_D \cdot K_{(\text{fase aceptora/fase doadora})}$$

Figura 21 - Classificação da HF-LPME



Fonte: elaborada pelo autor, com base em Guambarian, Yamini e Esrafili (2012).

Já o sistema de três fases pode ser representado pela Equação 6 e o coeficiente de distribuição pela Equação 7, na qual $C_{\text{eq fase aceptora}}$ é a concentração no estado de equilíbrio do analito na fase aceptora, $C_{\text{eq fase doadora}}$ é a concentração no estado de equilíbrio do analito na fase doadora, $K_{(\text{fase orgânica/fase doadora})}$ é o coeficiente de partição entre as fases orgânica e doadora, $K_{(\text{fase orgânica/fase aceptora})}$ é o coeficiente de partição entre as fases orgânica e aceptora, α_D é a fração não ionizada da concentração total do analito na fase doadora e α_A é a fração não ionizada da concentração total do analito na fase aceptora (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

Equação 6: $$A_{(\text{fase doadora})} \rightleftharpoons A_{(\text{fase orgânica})} \rightleftharpoons A_{(\text{fase aceptora})}$$

Equação 7:

$$D_{(\text{fase aceptora/fase doadora})} = \frac{C_{\text{eq fase aceptora}}}{C_{\text{eq fase doadora}}} = \frac{D_{\text{fase orgânica/fase doadora}}}{D_{\text{fase orgânica/fase aceptora}}} = \frac{\alpha_D \cdot K_{(\text{fase orgânica/fase doadora})}}{\alpha_A \cdot K_{(\text{fase orgânica/fase aceptora})}}$$

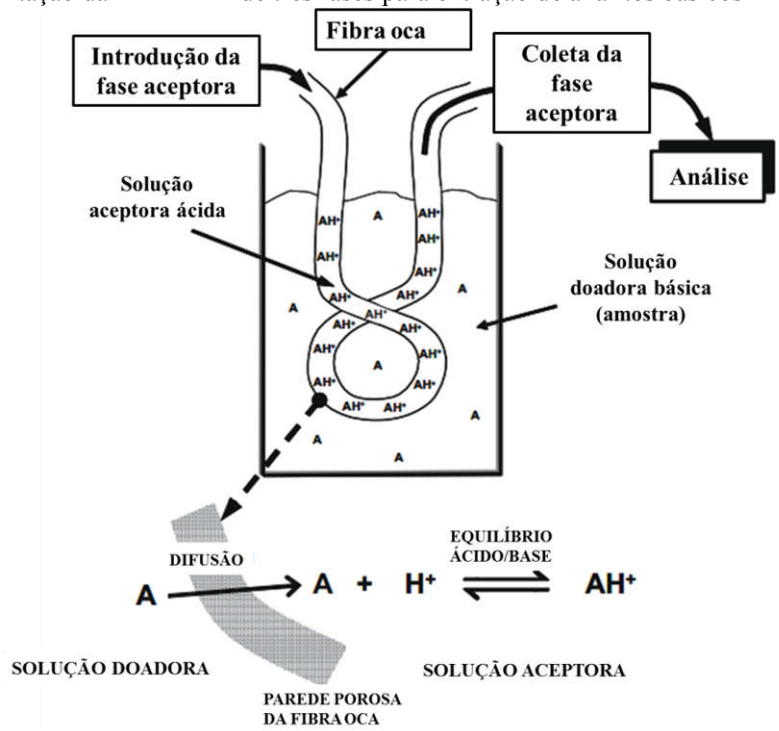
Na HF-LPME de três fases, tem-se a extração líquido-ar-líquido com fibra oca (HF-LGLME) que baseia-se na substituição do solvente orgânico para preenchimento dos poros da fibra por ar (FARAJZADEH; ASSADI, 2009; ZHANG; SU; LEE, 2006) e a extração líquido-líquido-líquido com fibra oca (HF-LLLME), que pode ser dividida em duas subclasses de acordo com a solução presente no interior da fibra, podendo ser um solvente orgânico distinto do solvente utilizado para impregnação da fibra ou uma solução aquosa (ALSHARIF et al., 2017; GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

A HF-LLLME utilizando solvente orgânico no lúmen da fibra pode basear-se no gradiente de concentração, no gradiente de pH ou no transporte por carreador e a HF-LLLME com solução aquosa no interior da fibra pode basear-se no gradiente de pH, no transporte por um carreador iônico ou pela aplicação de uma diferença de potencial (eletromembrana) (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

A extração por eletromembrana fundamenta-se na migração eletrocinética e pode ser utilizada para compostos ácidos ou básicos de baixa polaridade. Neste caso, um eletrodo fica em contato com a fase aceptora enquanto o outro fica imerso na fase doadora e a aplicação de tensão promove o transporte e diminui o tempo necessário para a ocorrência do processo (ALSHARIF et al., 2017).

Já a extração baseada no gradiente de pH é interessante para espécies ácidas e básicas. Conforme demonstrado na Figura 22, o pH da amostra é ajustado para um valor no qual os analitos permaneçam não ionizados com o intuito de melhorar a capacidade de extração pela fase orgânica. Os analitos são, então, transferidos por difusão passiva a partir da amostra aquosa para a fase orgânica contida nos poros da fibra oca e, posteriormente, para a solução aceptora que está no lúmen da mesma. A solução aceptora, por sua vez, deve estar em pH que permita a ionização do analito (HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; ZARGAR; HATAMIE, 2014) e, após a extração, pode ser submetida diretamente à análise por HPLC, CE ou LC-MS (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Figura 22 - Representação da HF-LPME de três fases para extração de analitos básicos



Fonte: Arce et al., 2009 - reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier.

Contudo, para compostos hidrofílicos, que possuem baixa afinidade pela fase orgânica presente nos poros da fibra, a HF-LPME convencional de duas ou três fases promove uma fraca extração. Logo, a adição de um carreador iônico ou também conhecido como reagente de par iônico pode melhorar a recuperação (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011).

Na HF-LPME mediada por carreador, o composto utilizado para formação do par iônico deve ter carga oposta ao analito de interesse e pode ser adicionado na amostra aquosa, como é o caso do ácido salicílico, do azul de bromotimol e do lauril sulfato de sódio ou pode ser dissolvido no solvente orgânico utilizado para a impregnação da fibra como acontece com o trietilfosfato, o ácido valpróico (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2006) e o Aliquat 336 (EBRAHIMZADEH, et al., 2011).

O transporte do analito nesta microextração depende da natureza e da concentração do carreador, do coeficiente de partição do par iônico formado, das propriedades da película líquida, da velocidade de agitação, da temperatura da extração e das características e da concentração do contra-íon (HO et al., 2003).

Para a ocorrência da extração, três etapas devem ocorrer: A) extração do analito da fase aquosa promovida pelo pH da solução que permite que os compostos estejam com carga

para a formação do par iônico; B) difusão do par iônico através da membrana líquida devido ao gradiente de concentração e C) liberação do analito na interface entre solvente orgânico e solução aceptora, devido à alta concentração de contra-íons presentes na fase aceptora, que interagem com os carreadores e se difundem em direção à fase doadora. Assim, o ciclo se repete até ser atingido o equilíbrio e o excesso de contra-íons impede o retorno do analito para a fase doadora, sendo essencial para a eficiência da extração, por atuar como força motriz para a transferência de massa (HO et al., 2003; YAMINI et al., 2006).

A HF-LPME tem sido utilizada para diferentes classes de amostras. Como a maioria das matrizes biológicas não são compatíveis com os instrumentos analíticos e são complexas demais para análise direta, a análise de compostos nestes fluidos é um processo que demanda a preparação da amostra, o que também pode auxiliar na concentração das substâncias de interesse e na remoção de compostos que possam interferir nas medidas (OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2016). Nos estudos de Ghambarian, Yamini e Esrafili (2012), Lee et al. (2008) e Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2005) são expostas as aplicações da HF-LPME de duas e três fases para amostras biológicas de urina, sangue, plasma, soro, saliva e leite e em nosso grupo de pesquisa já foi desenvolvido método para análise de lamotrigina em plasma utilizando a HF-LPME de três fases associada à eletroforese capilar (BARROS et al., 2016).

(WATERSON, 2010a)

4.2 OBJETIVOS

4.2 OBJETIVOS

Os objetivos são:

- Desenvolver e validar um método para extração do FLU em amostras de plasma por HF-LPME com o auxílio de delineamentos experimentais;

- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de um paciente que realizou tratamento com o FLU no HCFMRP/USP.

(WATERSON, 2010a)

4.3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.3 MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.3.1 Equipamentos

Além dos equipamentos descritos no item 3.3, foram utilizados um ultrassom da Quimis modelo Q3350 (Diadema, Brasil) para a remoção do excesso de solvente da fibra e um agitador do tipo vibrax Ika modelo VXR basic (Staufen, Alemanha).

4.3.2 Reagentes e solventes

O sulfato de sódio e o fosfato de sódio dibásico anidro foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil), o cloreto de sódio da Merck (Rio de Janeiro, Brasil), o etanol da J.T Baker (Phillipsburg, Estados Unidos) e o Adogen 464 da Evonik (Darmstadt, Alemanha). Já o metanol utilizado para preparo das soluções de trabalho foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o hidróxido de sódio, fosfato de sódio monobásico e o ácido clorídrico foram obtidos da Dinâmica (Diadema, São Paulo).

Os solventes orgânicos, grau analítico, avaliados para impregnação na fibra foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil) - o di-n-butil éter e o 1-octanol; da Mundial Química (São Paulo, Brasil) - a N,N-dimetilformamida (DMF); da Alfa Aesar (Ward Hill, Estados Unidos) - o di-n-hexil éter; da Sigma Aldrich (Seelze, Alemanha) - o acetato de butila e da Merck (Darmstadt, Alemanha) - o éter metil-terc-butílico (MTBE).

4.3.3 Padrões e soluções padrão

O FLU, de pureza superior a 98 %, foi adquirido da Sigma Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). As soluções estoque de FLU (1,25 $mg.mL^{-1}$) e de trabalho na faixa de concentração de 10 a 625 $\mu g.mL^{-1}$ foram preparadas em metanol e foram armazenadas em frascos âmbar a -20 ºC.

4.3.4 Condição analítica

A análise por HPLC utilizou as seguintes condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). A fase móvel foi composta por etanol: água (12,5:87,5, v/v) sendo mantida a temperatura em 45 ºC, a vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$ e a detecção em 210 nm.

4.3.5 Preparo da fibra

As fibras de polipropileno Q3/2 Accurel com 600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura da parede e poros de 0,2 µm foram adquiridas da Membrana (Wuppertal,

Alemanha). Para utilização na extração, estas foram dimensionadas para 13 cm de comprimento e acopladas com ponteiras plásticas adquiridas da Sorenson Bioscience (Salt Lake City, Estados Unidos). As ponteiras utilizadas para fixação da fibra foram previamente fixadas em tampas de poliuretano que se encaixam perfeitamente ao tubo, evitando a perda da amostra durante o processo de agitação da amostra. A configuração em U da HF-LPME foi selecionada para a realização da extração.

4.3.6 Obtenção e preparo da amostra

As amostras de plasma para o desenvolvimento do método foram obtidas de voluntários sadios e foram doadas pelo São Francisco Hemoterapia. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Anexo A).

Para ser utilizada para a extração, a amostra biológica foi descongelada a temperatura ambiente e submetida à centrifugação a 2200 *g* e 4 ºC por 15 minutos para sedimentação de materiais particulados.

4.3.7 HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH

Para esta etapa foram transferidos 50 µL de solução de FLU na concentração de 150 $\mu g.mL^{-1}$. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e 200 µL de plasma foram adicionados ao tubo. O volume foi completado para 4 mL com solução de fosfato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$ pH = 7,3. As fibras foram impregnadas com os solventes di-n-hexil, di-n-butil éter, DMF, MTBE, acetato de butila e 1-octanol por 10 segundos, com remoção do excesso do solvente por imersão em água por 5 s. As duas etapas de preparo da fibra foram realizadas com o auxílio de um aparelho de ultrassom, com posterior alocação da fibra no tubo de extração já contendo a fase doadora. A fase aceptora composta por solução de ácido clorídrico de 0,01 $mol.L^{-1}$ (60 µL) foi depositada no interior da fibra com o auxílio de uma microsseringa e os tubos foram agitados a 500 rpm por 50 minutos. Após a extração, 50 µL de fase aceptora foram coletados e o volume foi completado para 150 µL com fase móvel. Além disso, nesta etapa também foi avaliada a adição de etanol à fase aceptora para melhorar a solubilidade do analito. Cada condição avaliada foi realizada em triplicata (n = 3).

4.3.8 HF-LPME de duas fases

Para avaliar o uso da HF-LPME de duas fases para a extração do FLU de amostras de plasma, foi realizado o procedimento descrito no item anterior, sendo que os solventes utilizados para impregnar a fibra também foram empregados como fase aceptora. Após o

período de 50 minutos de extração, 50 µL de fase aceptora foram coletados, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi redissolvido em 150 µL de fase móvel.

4.3.9 HF-LPME de três fases mediada por carreador

Foi avaliado o uso de Adogen 464 como carreador. Neste caso, o volume de amostra foi completado utilizando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 $mol.L^{-1}$ e o carreador foi misturado ao solvente orgânico na proporção de 10 % para impregnação das fibras. Também foi estudado nesta etapa o uso de sulfato de sódio na fase doadora, a limpeza da fibra com acetona e o uso de fases aceptoras compostas por NaCl 1 $mol.L^{-1}$, NaCl 1 $mol.L^{-1}$ e HCl 0,01 $mol.L^{-1}$ e HCl 0,01 $mol.L^{-1}$, sendo cada condição desenvolvida em triplicata (n = 3).

4.3.9.1 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME mediada por carreador

A extração nesta fase foi realizada utilizando-se 500 µL de plasma enriquecido com 50 µL de solução de FLU na concentração de 250 $\mu g.mL^{-1}$. Um FFD ($2^{k-p} = 2^{8-4}$) de resolução IV foi utilizado para avaliar os fatores tempo de extração (A), pH da fase doadora (B), concentração de NaCl na fase aceptora (C), tempo de impregnação (D) e tempo de lavagem da fibra (E), concentração de carreador iônico (F), velocidade de agitação da amostra (G) e concentração de Na_2SO_4 (H). A recuperação do FLU foi utilizada como resposta e os experimentos foram realizados em triplicata, como também foi feito por Hadjmohammadi e Ghambari em 2012. Os níveis dos fatores avaliados encontram-se descritos na Tabela 23 e a matriz gerada é composta por 16 diferentes condições de extrações (n = 48), que foram realizadas em ordem aleatória e estão dispostas na Tabela 24.

Tabela 23 - Fatores e níveis para a construção da matriz do FFD $2^{(8-4)}$

Fatores	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)
(A) tempo de extração (min)	20	50
(B) pH da fase doadora	11	13
(C) concentração de NaCl na fase aceptora ($mol.L^{-1}$)	0,5	2
(D) tempo de impregnação da fibra (s)	5	20
(E) tempo de lavagem da fibra (s)	0	15
(F) concentração de carreador iônico (%, v/v)	5	25
(G) velocidade de agitação (rpm)	500	1000
(H) concentração de Na_2SO_4 (%)	10	25[a]

[a] concentração suficiente para saturação da solução

Tabela 24 - Condições de extração por HF-LPME realizadas no FFD $2^{(8-4)}$

Análise	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00
3	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00
5	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00
6	1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00
7	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	-1,00
9	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00
10	1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00
11	-1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00
12	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	1,00
13	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	1,00
14	1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	1,00	-1,00	-1,00
15	-1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00
16	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

4.3.9.2 Seleção da condição ótima de extração

Foram avaliados por meio de um CCD as variáveis tempo de extração (A), pH da fase doadora (B) e concentração de carreador iônico (F) e os cinco níveis avaliados estão dispostos na Tabela 25. O tempo de impregnação da fibra com o solvente orgânico foi de 15 s, seguido por remoção do excesso do solvente em água por 5 s. A velocidade de agitação foi fixada em 1000 rpm, o Na_2SO_4 foi adicionado em concentração suficiente para saturação da fase doadora e a fase aceptora foi composta por NaCl 1 $mol.L^{-1}$. Foram gerados 20 experimentos realizados em triplicata (n = 60), sendo oito experimentos resultantes de um delineamento fatorial completo, seis experimentos referentes aos pontos axiais e seis experimentos referentes aos pontos centrais. As condições estudadas pelo uso do CCD encontram-se na Tabela 26.

Tabela 25 - Fatores e níveis utilizados no CCD para otimização da extração por HF-LPME

	Níveis			Pontos estrela (α = 1,68)	
Fatores	**Baixo (-1)**	**Central**	**Alto (+1)**	**-α**	**+α**
(A) tempo de extração (min)	22	40	58	10	70
(B) pH da fase doadora	11,50	12,25	13,00	11,00	13,50
(F) concentração de carreador iônico (%)	9,1	15,0	20,9	5,0	25,0

Tabela 26 - Condições de extração avaliadas no CCD para a HF-LPME

Análise	A	B	F
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	-1,00	-1,00	1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	-1,00	1,00	1,00
5	1,00	-1,00	-1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	1,00	1,00	-1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	0	0	-1,68
10	0	0	1,68
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	-1,68	0	0
14	1,68	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Após a realização dos experimentos, gráficos de superfície de resposta foram construídos para os fatores que exerceram efeito sobre a recuperação do FLU. A função desejabilidade foi utilizada para a determinação da condição na qual a recuperação foi máxima. O programa Statistica® foi utilizado para construção das matrizes, para análise dos resultados do FFD e do CCD e para gerar os gráficos de superfície de resposta e de desejabilidade.

4.3.10 Validação do método

Assim como no capítulo anterior, o protocolo de validação foi baseado no Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos (EMA, 2011) e na Resolução nº 27 de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012).

Em tubos de extração de 10 mL foi realizado o enriquecimento das amostras. Para isso, foram adicionados 50 µL da solução de trabalho de FLU em metanol nas concentrações de 10 a 625 $\mu g.mL^{-1}$ e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. A seguir, foram adicionados 500 µL de plasma e o tubo foi agitado para solubilização do analito. Solução de NaOH 0,316 $mol.L^{-1}$ saturada com Na_2SO_4 foi adicionada a amostra totalizando um volume

de 5 mL. Após agitação em vórtex, os tubos foram submetidos à centrifugação a 2200 *g* por 15 minutos a 4 °C. Após isto, 3,5 mL de sobrenadante foram coletados e transferidos para os tubos de extração. As fibras impregnadas com o solvente orgânico e com o carreador iônico foram colocadas em contato com a amostra e após a adição da fase aceptora, a extração foi realizada. Ao final do processo, 50 µL de fase aceptora foram coletados com o auxílio de uma microsseringa de 100 µL e o volume foi completado para 130 µL com fase móvel para análise por HPLC de acordo com as condições descritas no item 4.3.4.

4.3.10.1 Curva de calibração

Curvas analíticas contendo seis níveis de concentração foram construídas para a avaliação da linearidade do método (Tabela 27). Cada nível foi realizado em quintuplicata (n = 5) no intervalo de concentração plasmática do FLU de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$, sendo a área do FLU disposta no eixo das ordenadas e a concentração plasmática no eixo das abcissas. O modelo de regressão linear com peso 1/x foi adotado e sua adequação foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), sendo realizados os cálculos dos valores de F e *p*, para um nível de confiança de 95 % e graus de liberdade n–1, utilizando o programa Minitab®, versão 18.

Tabela 27 - Níveis de concentração plasmática para obtenção da curva analítica para o FLU

Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	Classificação
1,00	LIQ - limite inferior de quantificação
2,00	CB - controle de qualidade de baixa concentração
12,50	-
31,25	CM - controle de qualidade de média concentração
50,00	CA - controle de qualidade de alta concentração
62,50	LSQ - limite superior de quantificação

4.3.10.2 LIQ

Para a determinação do LIQ, cinco amostras de plasma foram enriquecidas para a obtenção da concentração de 1,0 $\mu g.mL^{-1}$ e foram submetidas a extração conforme descrito no item 4.3.10. Os valores de concentração foram calculados baseados em uma curva analítica no intervalo de concentração plasmática de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e os valores de precisão e exatidão foram obtidos e comparados com os valores definidos pelos guias.

4.3.10.3 Precisão

A precisão foi determinada para os níveis de concentração referentes ao LIQ, CB, CM, CA e LSQ. Para a realização deste item foram utilizadas quintuplicatas para cada nível de concentração e as amostras foram submetidas à extração descrita no item 4.3.10. As

concentrações foram definidas a partir de uma curva analítica para o intervalo de concentração plasmática de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e a precisão dos dados obtidos foi calculada para três dias de análise (precisão intercorridas) e para um dia de análise (precisão intracorrida) de acordo com a Equação 1 do item 3.3.3.3.

4.3.10.4 Exatidão

A exatidão foi determinada para os mesmos níveis de concentração citados no item anterior e também foi realizada em quintuplicata. Foram obtidos os valores para um mesmo dia (intracorrida) e para três dias diferentes de análise (intercorridas), de acordo com a Equação 2 do item 3.3.3.4.

4.3.10.5 Efeito residual

Para a avaliação do efeito residual foi observado o aparecimento ou aumento do sinal analítico devido a uma possível contaminação proveniente de amostras de plasma analisadas previamente pela injeção de uma amostra branco antes da injeção de uma amostra referente ao LSQ e duas amostras branco após a injeção da amostra de concentração referente ao LSQ, todas submetidas ao procedimento de extração (ANVISA, 2012).

4.3.10.6 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método obtido de diferenciar o composto de interesse de outros compostos que possam estar presentes na amostra biológica (ANVISA, 2012). Foram utilizadas seis diferentes amostras de plasma, sendo uma lipêmica, uma hemolisada e quatro amostras normais. Em tempo de retenção próximo ao do FLU foi investigada a presença de resposta referente a possíveis interferentes por meio de comparação dos cromatogramas obtidos com o de amostras referentes ao LIQ.

4.3.10.7 Recuperação

Embora não seja um item obrigatório para a realização da validação, a recuperação média do FLU de amostras de plasma pela HF-LPME foi avaliada (n = 15). O cálculo foi realizado comparando-se as áreas referentes ao pico do analito de amostras do FLU em solvente com as áreas do FLU obtidas após extração de amostra enriquecida com o FLU (CASSIANO et al., 2009) para os cinco níveis de concentração referentes ao LIQ, CB, CM, CA e LSQ.

4.3.10.8 Estudos de estabilidade do fármaco em plasma

Para assegurar que a concentração na amostra quando analisada permanece a mesma do dia da coleta, estudos de estabilidade foram realizados, pois os fármacos e seus metabólitos podem sofrer degradação por ação do metabolismo e de processos físicos e químicos quando estão na amostra biológica (REED, 2016). Entre os estudos realizados estão os estudos de estabilidade de curta e longa duração, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento, os quais foram realizados em quadruplicata (n = 4) para as concentrações de 2,0 e 50,0 $\mu g.mL^{-1}$, referentes ao CB e ao CA. O cálculo da concentração obtida foi baseado em uma curva de calibração extraída para o intervalo de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ e os resultados foram comparados com os valores nominais.

❖ **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

A estabilidade do fármaco foi avaliada após três ciclos de congelamento e descongelamento. Para isso, amostras de plasma foram enriquecidas com o padrão de FLU e foram congeladas a temperatura de -20 ºC por 24 horas. Após este período as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e foram novamente congeladas por pelo menos 12 horas até contemplar os três ciclos. A extração das amostras foi realizada como descrito no item 4.3.10.

❖ **Estabilidade de curta duração**

As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 horas, tempo suficiente para que todas as demais amostras fossem analisadas. Após este período, as amostras do estudo de estabilidade de curta duração foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 4.3.10.

❖ **Estabilidade de longa duração**

As amostras de plasma foram enriquecidas e mantidas em freezer (-20°C) por trinta e cinco dias para a realização da estabilidade de longa duração. Após este período as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e foram submetidas ao processo de extração descrito no item 4.3.10.

❖ **Estabilidade pós-processamento**

Para avaliar a estabilidade após o processamento da amostra, quatro amostras de cada concentração analisada foram submetidas à extração e analisadas por HPLC. Ao final da

corrida analítica as amostras foram injetadas novamente e as concentrações de FLU foram determinadas a partir de uma curva de calibração com intervalo de concentração de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$. Durante o período de espera, as amostras permaneceram no autoinjetor a temperatura ambiente.

4.3.10.9 Determinação da concentração de FLU em amostra de plasma de paciente em tratamento

Após a validação do método, duas amostras de plasma coletadas de um paciente portador de neuromicose e que realizou tratamento com o FLU no HCFMRP/USP foram utilizadas. O intervalo entre as coletas foi de sete dias e as amostras do paciente foram descongeladas e mantidas por 30 minutos em banho-maria a 56 ºC (SPIRE et al., 1985) como etapa prévia à extração. A determinação da concentração plasmática de FLU foi realizada baseada em uma curva de calibração no intervalo de concentração de 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Anexo A).

(WATERSON, 2010b)

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os testes realizados neste estudo foi utilizada a fibra de polipropileno Q3/2 Accurel com 13 cm de comprimento. Esta fibra também foi selecionada para as extrações realizadas por Ghamari et al. (2016), Hadjmohammadi e Ghambari (2012), Hou e Lee (2003), Magalhães e Bonato (2008) e Payán et al. (2011).

4.4.1 HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH

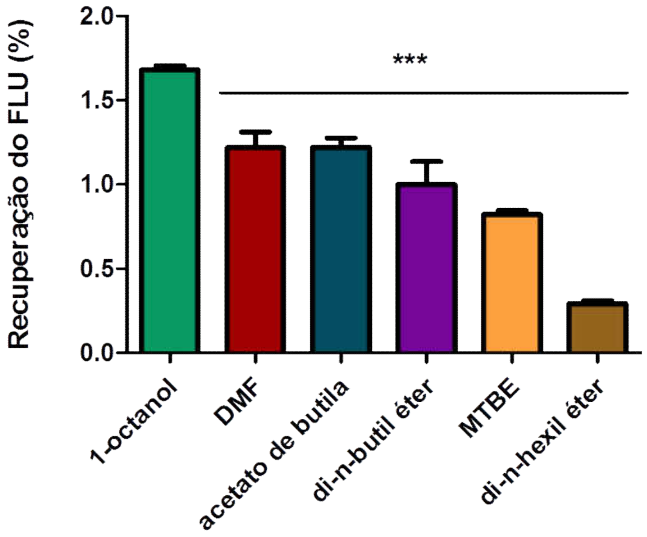
Inicialmente a HF-LPME de três fases por possuir fase aceptora aquosa e por oferecer compatibilidade com os sistemas analíticos HPLC e CE (HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001; LEE et al., 2008) foi avaliada.

Nesta microextração os parâmetros que devem ser estudados são: o tempo e a velocidade de extração, o solvente orgânico para impregnação da fibra, os pHs e volumes das fases doadora e aceptora e a força iônica da amostra (HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012; MERIB; CASAREK, 2013).

Para compor a fase doadora foi selecionada solução tampão fosfato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$, pH 7,3 e a solução de HCl 0,01 $mol.L^{-1}$, pH 2,0 para compor a fase aceptora, pois para promover a transferência dos analitos é recomendável que o pH da fase doadora esteja em uma faixa na qual o analito se mantenha não ionizado e o pH da fase aceptora esteja em valor que permita a ionização do composto a ser extraído (HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012).

O tempo de extração foi mantido em 50 minutos e a agitação em 500 rpm para a seleção do solvente orgânico a ser utilizado para a impregnação da fibra. Os solventes avaliados foram di-n-hexil, di-n-butil éter, DMF, MTBE, acetato de butila e 1-octanol. O solvente ideal deve possuir como características: afinidade pelo analito de interesse, baixa volatilidade e miscibilidade com a água para evitar a perda durante a extração, fácil imobilização na fibra, baixa viscosidade para favorecer o fluxo, baixa tendência em dissolver ou transferir os interferentes presentes na amostra, e, se possível, baixa toxicidade (BAHRAMI et al., 2017; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012; HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; YAMINI et al., 2006). O 1-octanol foi o solvente que permitiu melhor transferência do analito da fase doadora para a fase aceptora ($p < 0,001$), embora os valores de recuperação encontrados tenham sido baixos (Figura 23). Este solvente também promoveu maior fator de enriquecimento para as extrações realizadas por Bahrami et al. (2017), Hadi, Makahleh e Saad (2012), Hadjmohammadi e Ghambari (2012) e Piroozi et al.(2014).

Figura 23 - Avaliação do tipo de solvente de impregnação na fibra para a extração do FLU por HF-LPME de três fases baseada no gradiente de pH



Condições da extração: solução doadora composta por plasma e tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,3, fase aceptora composta pelo HCl 0,1mol.L^{-1}. Extração realizada por 50 minutos com agitação de 500 rpm. Impregnação da fibra por 10 s e lavagem da fibra com água para remoção do excesso de solvente por 5 s. *** $p < 0{,}001$.
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism®.

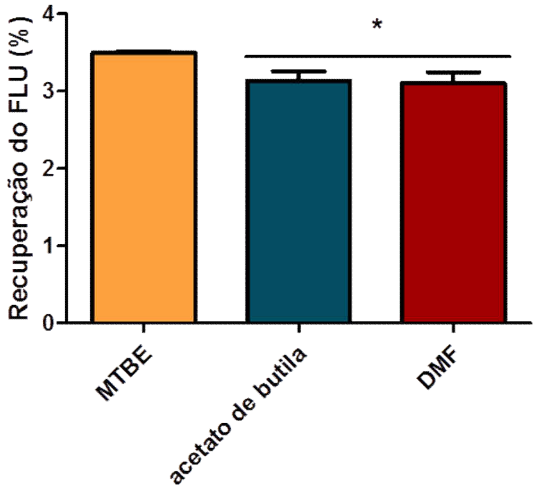
Além disso, também foi avaliada se a adição de etanol na fase aceptora poderia melhorar a solubilidade do FLU e, consequentemente, aumentar a eficiência da extração. Foi estudada a proporção de 20 % de etanol, pois altas quantidades de solvente na fase aceptora podem acarretar em perdas de volume devido à evaporação. Assim como observado por Magalhães e Bonato em 2008, não houve melhora da recuperação com a modificação da fase aceptora, sendo obtido valor de recuperação de 1,5 %.

4.4.2 HF-LPME de duas fases

A extração utilizando o sistema de duas fases foi realizada com o intuito de promover aumento da recuperação do FLU. Foram estudados os solventes di-n-hexil éter, di-n-butil éter, DMF, MTBE, acetato de butila e 1-octanol. Foi observado que alguns solventes demandam pouco tempo para evaporação, como o MTBE, enquanto outros demoram muito, como o di-n-hexil éter. As extrações utilizando o 1-octanol não foram injetadas no sistema analítico selecionado, pois o tempo para evaporação do solvente inviabiliza a extração, o que fundamenta o fato de cerca de 80 % dos estudos envolvendo a HF-LPME de duas fases utilizarem a GC para análise (LEE et al., 2008). O di-n-hexil e o di-n-butil éter tiveram recuperação muito baixa, não sendo possível visualizar o pico do FLU nos cromatogramas

obtidos. Já os resultados obtidos para o DMF, o acetato de butila e o MTBE estão expostos na Figura 24, sendo obtidos valores de 3,1; 3,1 e 3,5 % de recuperação, respectivamente. Portanto, em relação à HF-LPME de três fases estudada no item 4.4.1, foi obtido um aumento significativo da recuperação do FLU.

Figura 24 - Avaliação da recuperação do FLU utilizando a HF-LPME de duas fases



Condições da extração: solução doadora composta por plasma e tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,3, fase aceptora composta pelo mesmo solvente utilizado para a impregnação da fibra. Extração realizada por 50 minutos com agitação de 500 rpm. Impregnação da fibra por 10 s e lavagem da fibra com água para remoção do excesso de solvente por 5 s. * $p < 0,05$.
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism®.

4.4.3 HF-LPME de três fases mediada por carreador

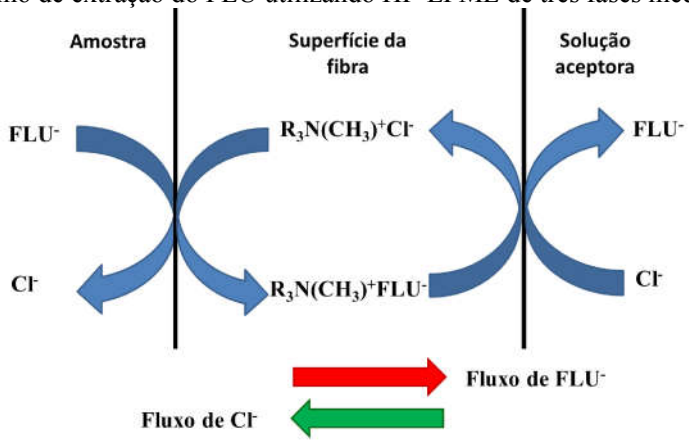
A HF-LPME de duas e três fases tem sido utilizada para a extração de vários compostos, entre eles pesticidas, aminas aromáticas, compostos fenólicos, hidrocarbonetos aromáticos, porém, para aumentar a recuperação de compostos hidrofílicos, que apresentam baixa afinidade pelo solvente orgânico presente nos poros da fibra, o uso de carreador iônico pode ser benéfico (BAHRAMI et al., 2017; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Na literatura é muito encontrado o uso do carreador aniônico cloreto de metiltrioctilamônio (Aliquat 336) (CHAIEB et al., 2015; EBRAHIMZADEH et al., 2011; ESRAFILI et al., 2012; SHARIATI; YAMINI; ESRAFILI, 2009; YAMINI et al., 2006; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011; ZARGAR; PARHAM; HATAMIE, 2016), que permanece ionizado em toda a faixa de pH (SHARIATI; YAMINI; ESRAFILI, 2009). Devido à dificuldade de obtenção deste reagente, neste estudo foi utilizado

o cloreto de metiltrialquil (C_8-C_{10}) amônio (Adogen 464), o qual apresenta estrutura semelhante ao Aliquat 336, porém com cadeias que variam de 8 a 10 carbonos.

A Figura 25 ilustra o mecanismo para a transferência do FLU da fase doadora para a fase aceptora utilizando este carreador iônico. O Adogen 464 é um carreador catiônico e interage com FLU, carregado negativamente, devido ao alto pH promovido pelo uso de NaOH na fase doadora. O par iônico formado se difunde através da fibra cujos poros estão preenchidos com o solvente orgânico e na interface entre a solução aceptora e a fibra, devido à alta concentração de íons cloreto presente na fase aceptora que é composta por solução de cloreto de sódio ou ácido clorídrico, o analito é liberado e o carreador interage com os íons cloreto e se difunde em direção à fase doadora.

Figura 25 - Mecanismo de extração do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada carreador

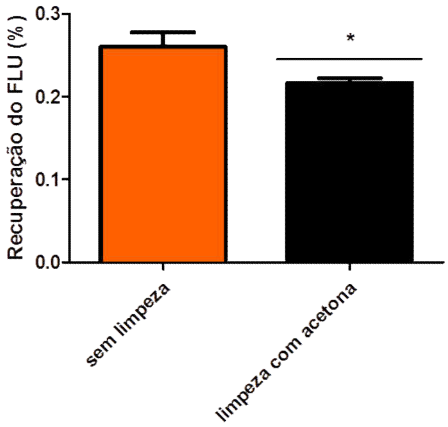


Fonte: elaborada pelo autor, com base no trabalho de Yamini et al. (2006).

Como o 1-octanol foi o solvente orgânico que permitiu melhor transferência de massa na HF-LPME de três fases realizada anteriormente, ele foi mantido como solvente para impregnação da fibra e, como alguns trabalhos realizam a lavagem prévia da fibra com acetona para remoção de possíveis contaminantes (BAHRAMI et al., 2017; EBRAHIMZADEH et al., 2011; LV et al., 2013), sendo relatado inclusive o aumento da recuperação (BARDSTU et al., 2007), foi realizada a comparação da extração do FLU de fibras submetidas ao processo de limpeza com acetona e ultrassom por 5 minutos com fibras não submetidas ao procedimento. Após a lavagem com acetona as fibras foram colocadas sobre papel de filtro e mantidas a temperatura ambiente até total evaporação do solvente. Foi observada uma pequena redução da recuperação do analito (valor de p = 0,01) (Figura 26) quando as fibras foram submetidas à lavagem prévia. Além disso, não foi observada diferença

nos cromatogramas obtidos quanto a possíveis interferentes, de modo que as fibras foram utilizadas sem lavagem prévia para os testes subsequentes.

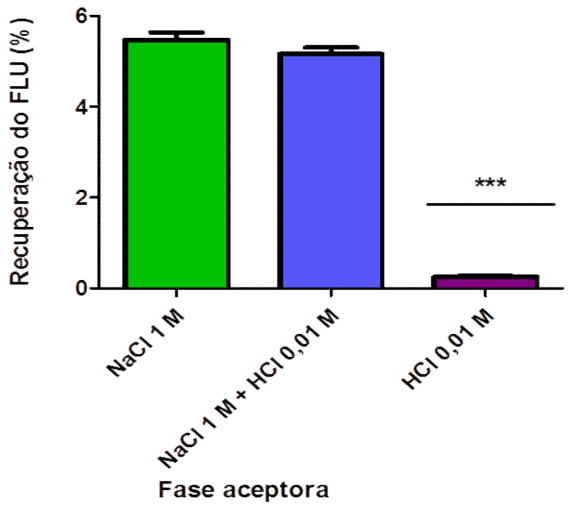
Figura 26 - Avaliação da influência da lavagem prévia da fibra com acetona na recuperação do FLU



Condições da extração: solução doadora composta por plasma e NaOH 0,1 mol.L^{-1}, fase aceptora composta por HCl 0,01 mol.L^{-1}, impregnação da fibra por 10 s utilizando solução composta por 1-octanol : Adogen 464 (90:10, v/v) e lavagem da fibra com água para remoção do excesso de solvente por 5 s. Extração realizada por 50 minutos com agitação de 500 rpm. * $p < 0,05$.
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism®.

Também foi avaliada a influência da composição da fase aceptora na recuperação do FLU. Foram utilizadas solução de NaCl 1 mol.L^{-1}, solução de HCl 0,01 mol.L^{-1} e a combinação NaCl 1 mol.L^{-1} e HCl 0,01 mol.L^{-1}, sendo obtidos valores de recuperação de 5,5; 0,3 e 5,2 %, respectivamente. A Figura 27 ilustra os resultados obtidos. Pode-se observar que quando a fase aceptora é composta apenas por solução ácida a recuperação é muito baixa. A adição de NaCl, embora promova o aumento do sinal analítico em tempo inferior a 2 minutos nos cromatogramas obtidos, se faz necessária para a ocorrência da transferência do analito, pois promove o gradiente de íons cloreto necessário para a extração, aumentando a recuperação de 0,3 para cerca de 5,2 %. Comparando-se as fases aceptoras compostas por NaCl e NaCl em solução ácida, não houve diferença entre as recuperações obtidas (valor de $p = 0,06$), sendo selecionada a fase aceptora composta apenas por NaCl para as próximas etapas. Esta fase aceptora contendo NaCl também foi selecionada por Chaieb et al. (2015), Esrafili et al. (2012), Shariati, Yamini e Esrafili (2009) e Zargar, Parhame e Hatamie (2016).

Figura 27 - Avaliação da influência da composição da fase aceptora na recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador



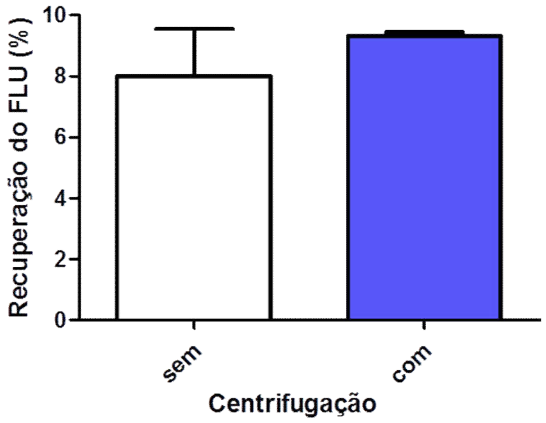
Condições da extração: solução doadora composta por plasma e NaOH 0,1 $mol.L^{-1}$, impregnação da fibra por 10 s utilizando solução composta por 1-octanol : Adogen 464 (90:10, v/v) e lavagem da fibra com água para remoção do excesso de solvente por 5 s. Extração realizada por 50 minutos com agitação de 500 rpm. *** $p < 0,001$.
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism®.

Segundo Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2006) a recuperação de analitos de amostras de plasma é na maioria das vezes inferior a recuperação obtida para amostras de água. Entre as possíveis razões para a ocorrência deste fenômeno podem estar a viscosidade do plasma, a interação dos analitos com as proteínas ou as interações entre as proteínas plasmáticas e o carreador. Para diminuir a última interação apresentada, que corresponde possivelmente ao principal motivo da diminuição da recuperação, pode-se realizar uma etapa prévia de preparo da amostra com precipitação de proteínas utilizando solventes ou pode-se acrescentar Na_2SO_4 às amostras.

Com o intuito de reduzir o uso de solventes no desenvolvimento do método, o uso de sal foi preferido. O Na_2SO_4 foi adicionado na solução de NaOH utilizada para diluição da amostra de plasma e ajuste do pH da fase doadora em quantidade suficiente para saturar a solução. Além disso, as amostras foram divididas em dois grupos para avaliar a necessidade de centrifugação após a adição da solução ao plasma. Para isso, metade dos tubos (n = 3) foram centrifugados por 15 minutos a 2200 *g* e 4 ºC e a outra metade (n = 3) foi mantida na bancada durante este período de tempo. Na Figura 28 pode-se constatar que as amostras não centrifugadas apresentaram maior variação entre as triplicatas, possivelmente devido a não remoção dos compostos que precipitaram do meio e que podem obstruir os poros da fibra.

Também foi identificada a melhora da recuperação com o uso de Na_2SO_4 para a precipitação de proteínas plasmáticas, sendo obtido valor médio de 9,3 %.

Figura 28 - Avaliação da influência da centrifugação na recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador



Condições da extração: solução doadora composta por plasma e solução de NaOH 0,1 $mol.L^{-1}$ saturada com Na_2SO_4, impregnação da fibra por 10 s utilizando solução composta por 1-octanol : Adogen 464 (90:10, v/v) e lavagem da fibra com água para remoção do excesso de solvente por 5 s. Extração realizada por 50 minutos com agitação de 500 rpm.
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism®.

4.4.3.1 Identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME mediada por carreador

Os delineamentos ainda são pouco explorados para a otimização dos parâmetros que influenciam na eficiência da HF-LPME. Destacam-se nesta área o estudo desenvolvido por Emídio et al. (2010), que analisaram canabinóides em amostras de cabelo, o trabalho de Ebrahimzadeh et al. (2012) que determinaram maleato de clorfeniramina e bromidrato de dextrometorfano em amostras de plasma e a análise de muscimol em amostras de urina desenvolvida por Ncube et al. (2016).

Entre os delineamentos, o FFD é o delineamento mais popular entre os de primeira ordem devido ao baixo custo e simplicidade e é quase mandatório realizá-lo quando o número de fatores envolvidos é alto (EBRAHIMZADEH et al., 2011). Para a identificação dos parâmetros que influenciam a extração do FLU de amostras de plasma foi realizado um FFD envolvendo oito variáveis e cada experimento gerado foi realizado em triplicata, pois a repetição de amostras para cada combinação de fatores permite uma melhor estimativa dos erros experimentais, o que ajuda na determinação se as diferenças entre os dados obtidos são

realmente significativas (HANRAHAN; MONTES; GOMEZ, 2008). Na Tabela 28 estão representados os valores de área e de recuperação obtidos para as análises realizadas.

Tabela 28 - Área e recuperação média (R) do FLU obtidas para as análises realizadas no FFD (n = 3)

Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)	Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)
1	86253 ± 2362	3	9	100037 ± 4870	3
2	107598 ± 5656	3	10	78920 ± 1431	2
3	213632 ± 12428	7	11	102510 ± 5576	3
4	87566 ± 5143	3	12	238945 ± 7904	8
5	54610 ± 746	2	13	63066 ± 3891	2
6	68749 ± 2403	2	14	58282 ± 2704	2
7	188931 ± 23227	6	15	178891 ± 5862	6
8	207083 ± 6790	7	16	275848 ± 15683	9

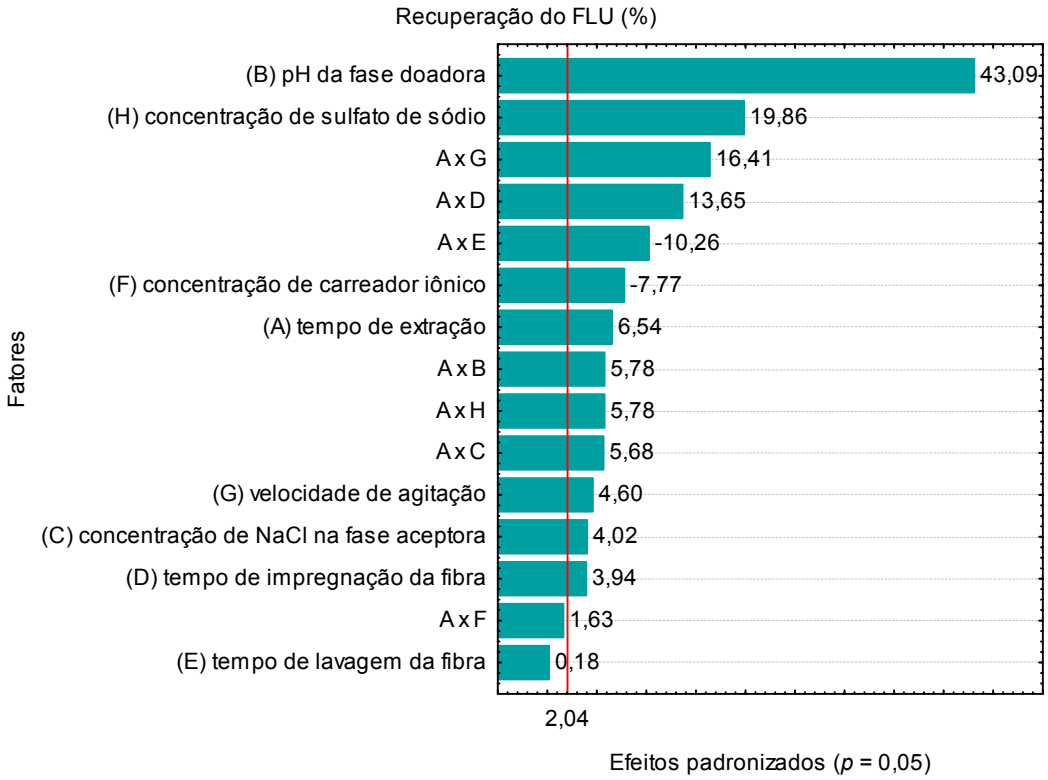
DP - estimativa do desvio padrão absoluto.

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando o programa Statistica® e foi construído um gráfico de Pareto para representação dos efeitos dos fatores estudados e das interações de primeira ordem sobre a recuperação do FLU (Figura 29). O valor de *t* crítico, representado pela linha vermelha, foi de 2,04 para um valor de *p* de 0,05 e os comprimentos das barras são proporcionais aos valores absolutos dos efeitos padronizados, de modo que os fatores cujas barras ultrapassam o valor de *t* crítico são considerados relevantes para a melhora da resposta avaliada.

Observa-se que o efeito da concentração de Na_2SO_4 sobre a recuperação foi positivo, ou seja, o aumento da concentração deste sal presente na fase doadora promoveu aumento na recuperação do FLU, por isso, optou-se por trabalhar com o uso de solução de NaOH saturada com este composto iônico, como também foi realizado por Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2006) e Payán et al. (2011).

O pH da amostra também foi avaliado nesta etapa, pois a interação do FLU com o carreador só ocorre quando o FLU está carregado negativamente. Considerando que o valor de pKa do FLU é de 11,01 ± 0,29, no FFD foi avaliada a adição de solução de NaOH nas concentrações de 0,001 e 0,1 $mol.L^{-1}$, para proporcionar pHs de 11 e 13, respectivamente. Pode-se observar na Figura 29, que quanto maior o pH da amostra, maior foi a recuperação do FLU, devido a um aumento da concentração de FLU disponível para interação com o carreador. Entre os estudos que também utilizaram o NaOH para alcalinizar a amostra, estão os de: Bahrami et al. (2018), Esrafili, Yamini e Shariati (2007), Hou e Lee (2003), Rasmussen et al. (2000), Yamini et al. (2006), Zargar e Hatamie (2014).

Figura 29 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores sobre a recuperação do FLU utilizando HF-LPME de três fases mediada por carreador. A linha vertical define o nível de confiança de 95 %.



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Em relação à concentração de Adogen 464 utilizada, foi observado que quando a concentração do carreador é baixa, a formação de pares iônicos é insuficiente e acarreta em baixo enriquecimento, porém quando a quantidade de carreador é alta, de 30 a 40 %, a membrana líquida torna-se muito viscosa e o fluxo do par iônico fica comprometido (YAMINI et al., 2006; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011), por isso, nesta etapa a concentração de carreador foi avaliada de 5 a 25 %. Foi observado que o aumento da concentração do carreador teve efeito negativo sobre a eficiência da microextração, de modo que na próxima etapa a influência desta variável será melhor avaliada.

Outro parâmetro que precisa ser otimizado é o tempo de extração. Para garantir a repetibilidade do método é necessário determinar o tempo mínimo para que o equilíbrio entre a amostra, a fase orgânica e a fase aceptora seja alcançado (BAHRAMI et al., 2018; YAMINI et al., 2006; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011). Foi observado que o aumento no tempo de extração de 20 para 50 minutos no FFD promoveu aumento da recuperação do FLU. Além disso, o tempo de extração é a variável que interage com quase todas as demais variáveis, promovendo efeito que pode influenciar na recuperação,

por isso, optou-se por estudá-la em mais níveis no CCD.

Já a velocidade de agitação afeta a cinética da extração, podendo aumentar a taxa de extração e reduzir o tempo para atingir o equilíbrio (BAHRAMI et al., 2018; BEN-HANDER et al., 2015; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; GHAMARI et al., 2016; HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012). No FFD foram avaliados os valores de 500 e 1000 rpm. Valores superiores não foram testados, pois acarretam em perda de fase aceptora por desencaixe da fibra das ponteiras. O efeito desta variável foi de 4,60, cerca de dez vezes inferior ao efeito do pH, porém para auxiliar no aumento da recuperação, o valor máximo de 1000 rpm foi mantido para os próximos estudos.

A concentração de NaCl na fase aceptora, por sua vez, foi avaliada de 0 a 2 $mol.L^{-1}$ no FFD, assim como nos trabalhos de Yamini et al. (2006) e de Zargar, Parham e Hatamie (2016). O aumento da concentração de NaCl promove, segundo Bahrami et al. (2018) e Yamini et al. (2006), um aumento do gradiente de íons cloreto, que é a força motriz do processo. Contudo, com o aumento da concentração de sal na fase aceptora, o cromatograma apresenta sinal mais intenso nos primeiros minutos de análise, o que pode comprometer o limite de quantificação do FLU, cujo sinal tem intensidade bem inferior. Por isso, devido ao baixo efeito deste parâmetro (+ 4,02) preferiu-se trabalhar com a fase aceptora contendo NaCl 1 $mol.L^{-1}$, concentração bastante utilizada nos estudos com HF-LPME envolvendo carreadores iônicos. Esse sinal intenso também é observado nos primeiros minutos dos cromatogramas obtidos por Zargar, Parham e Hatamie (2016) que utilizaram amostras de urina e de Shatiati, Yamini e Esrafili (2009) que usaram amostras de leite, plasma e água.

O tempo de impregnação da fibra com solvente orgânico não é um parâmetro comumente otimizado durante o desenvolvimento do método. Nesta etapa as fibras foram impregnadas por 5 e 20 segundos. Foi verificado que o aumento do tempo de contato entre a fibra e o solvente 1-octanol promoveu aumento da recuperação (efeito positivo de 3,94), por isso, com o intuito de melhorar a recuperação sem estender o tempo de preparo da fibra ficaram estabelecidos 15 s para impregnação do solvente orgânico na fibra, tempo também utilizado por Bahrami et al. (2018) e Ghamari et al. (2016).

A lavagem da fibra em frasco contendo água e sob sonicação não afetou a eficiência da extração (Figura 29). No entanto, como sempre a remoção do excesso de solvente se faz necessária, optou-se por imergir a fibra por 5 segundos no tubo com água para garantir que não ocorresse variação na recuperação do FLU entre as extrações devido a pequenas variações da quantidade de solvente na fibra e, consequentemente, de carreador iônico. O tempo para essa etapa, na literatura, varia de 5 s (AL AZZAM et al., 2010; BEN-HANDER et al., 2015;

HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012; NCUBE et al., 2016) a 30 s (EBRAHIMZADEH et al., 2012; PAYÁN et al., 2011), sendo que a maioria utiliza 10 s (BAHRAMI et al., 2017; BAHRAMI et al., 2018; EMIDIO et al., 2010; ESRAFILI et al., 2012; ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007; GHAMARI et al., 2016; HADJMOHAMMADI; GHAMBARI, 2012; TAHMASEBI; YAMINI; SALEH, 2009).

Portanto, com exceção do tempo de lavagem da fibra e da interação entre tempo de extração e concentração de carreador iônico, todos os demais fatores foram considerados importantes para a eficiência da extração. Observou-se que o parâmetro de maior efeito foi o pH da fase doadora, seguido pela concentração de Na_2SO_4, concentração de Adogen 464 e tempo de extração. Como na maioria dos casos na primeira triagem não é necessária a investigação de interações entre os fatores, mas sim determinar quais os fatores têm uma grande influência nos resultados para que estes possam ser melhor estudados (LUNDSTEDT et al., 1998), optou-se por avaliar na próxima etapa os fatores pH da fase doadora, concentração de Adogen 464 e tempo de extração.

4.4.3.2 Seleção da condição ótima de extração

Nesta etapa, as variáveis pH da fase doadora, concentração de Adogen 464 e tempo de extração foram avaliadas em cinco níveis de concentração ($-\alpha$, -1, 0, +1 e $+\alpha$).

O uso de apenas três variáveis no delineamento de segunda ordem, para a otimização do processo, foi um critério adotado também por Khodadoust e Hadjmohammadi (2011), Panagiotou, Sakkas e Albanis (2009) e Stalikas et al. (2009), pois a inclusão de um grande número de variáveis na realização do CCD gera um número de experimentos muito elevado e, a partir de três fatores, a superfície de resposta já não pode ser visualizada em sua totalidade (DEJAEGHER; HEYDEN, 2011).

O estudo envolveu o uso de 20 experimentos, realizados em triplicata, sendo 6 condições referentes ao ponto central (análises de 15 a 20). Os resultados obtidos estão representados na Tabela 29, sendo 9 % o maior valor de recuperação obtido.

Tabela 29 - Área e recuperação média (R) obtidas para o FLU para as análises realizadas no CCD (n = 3)

Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)	Análise	Área FLU ± DP	R FLU (%)
1	94516 ± 4914	3	9	96329 ± 2262	3
2	94496 ± 1965	3	10	100682 ± 8578	3
3	172716 ± 7528	5	11	88921 ± 2124	3
4	118538 ± 2668	4	12	281342 ± 3594	9
5	95720 ± 2421	3	13	72819 ± 2088	2
6	112152 ± 6398	3	14	78351 ± 1533	2
7	209916 ± 5249	6	15-20	95761 ± 5200	3
8	139034 ± 612	4			

DP - estimativa do desvio padrão absoluto.

Os resultados de recuperação das 60 extrações realizadas foram utilizados para a construção de gráficos de superfície de resposta e para delinear a resposta em função das variáveis envolvidas na HF-LPME.

De acordo com os coeficientes apresentados na Tabela 30, tem-se que a recuperação do FLU é influenciada por todas as variáveis avaliadas no CCD , com exceção das interações entre concentração de carreador e tempo de extração e entre pH da fase doadora e tempo de extração. Além disso, efeitos quadráticos foram observados para o pH e para o tempo de extração. Para facilitar a representação do modelo pela equação polinomial, os códigos A (tempo de extração), B (pH da fase doadora) e F (concentração de carreador iônico) foram mantidos, sendo obtida a equação: Recuperação do FLU = 3,00 + 0,19.A – 0,17.A^2 + 1,28.B + 1,02.B^2 – 0,23.F – 0,54.B.F. O coeficiente de determinação ajustado do modelo foi de 0,9013, com valor de F_{calc} igual a 78,15 superior ao $F_{tab(6;53;0,05)}$ = 2,28. Soma-se a esta informação o valor de F para a falta de ajuste de 1,29 ser inferior ao $F_{tab(6;53;0,05)}$ de 2,28. Tem-se, portanto, que o modelo gerado pode ser utilizado para predizer a resposta, pois segundo Teófilo e Ferreira (2006), um bom modelo precisa possuir uma regressão significativa ($F_{calc} \geq F_{tab}$) e uma falta de ajuste não significativa ($F_{calc} < F_{tab}$) e um valor de coeficiente de determinação o mais próximo possível do valor de 1,0.

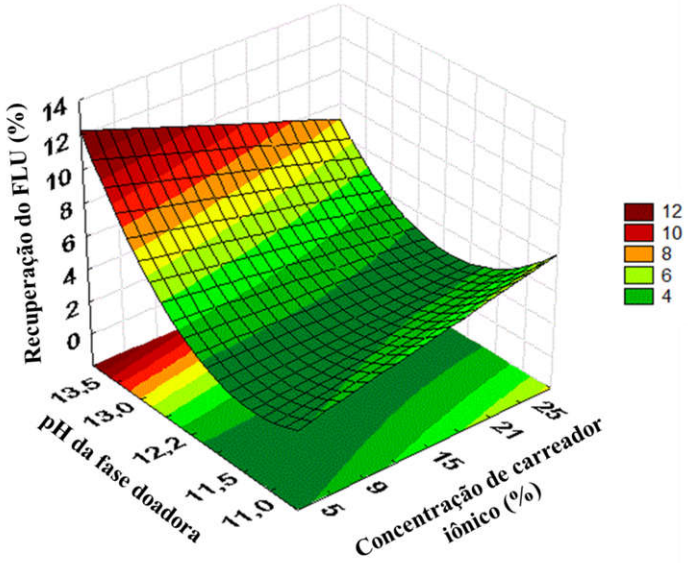
Tabela 30 - Coeficientes do modelo de superfície de resposta para a extração do FLU de amostras de plasma por HF-LPME mediada por carreador

Efeitos	**Coeficientes da resposta recuperação do FLU**
A = tempo de extração	0,19
B = pH da fase doadora	1,28
F = concentração de carreador iônico	-0,23
A^2	-0,17
B^2	1,02
B.F	-0,54

Os efeitos e as interações que não tiveram efeito significativo sobre a recuperação do FLU, com $p > 0,05$ não foram representados.

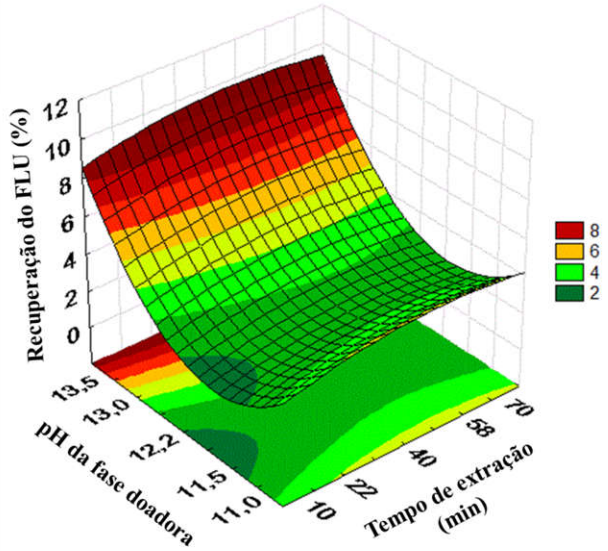
As Figuras 30, 31 e 32 mostram os gráficos de superfície da recuperação do FLU em função das variáveis analisadas no CCD.

Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis concentração de carreador iônico e pH da fase doadora sobre a recuperação do FLU



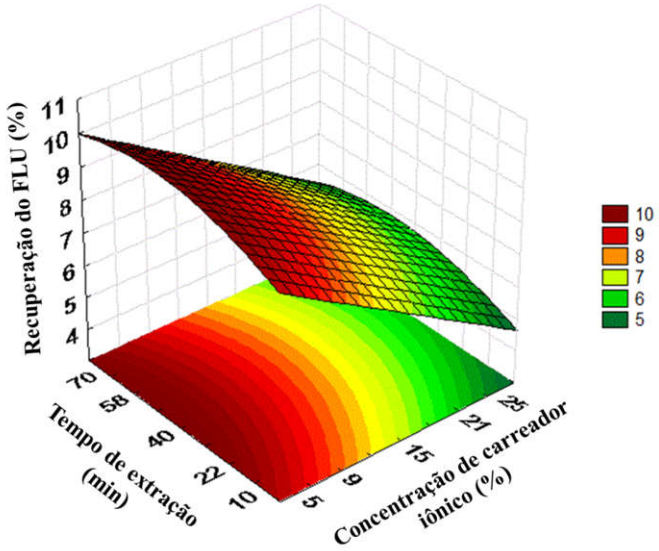
Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis tempo de extração e pH da fase doadora sobre a recuperação do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta da influência das variáveis concentração de carreador iônico e tempo de extração sobre a recuperação do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

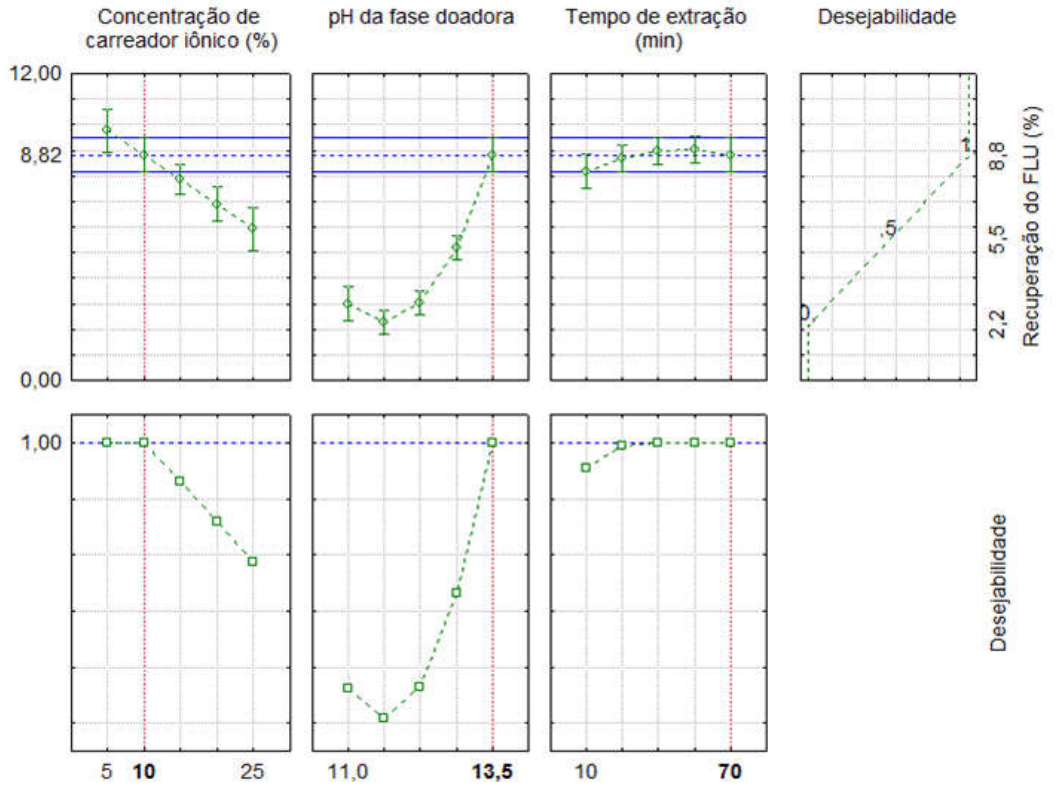
Pode-se observar que o pH é a variável com maior influência sobre a recuperação do FLU (Figuras 30 e 31) e que o aumento do pH promoveu aumento da transferência do FLU para a fase aceptora. O pKa do FLU é de 11,01 ± 0,29, portanto, o aumento do valor do pH da fase doadora de 11,00 até 13,50 promoveu aumento da quantidade de FLU com carga negativa, permitindo a formação de maior quantidade de pares iônicos capazes de atravessar o

solvente orgânico presente nos poros da fibra, portanto, ao se observar a Figura 33, na qual está o gráfico de desejabilidade obtido, nota-se um aumento acentuado da recuperação com o aumento da basicidade da fase doadora.

Em relação à concentração de carreador iônico (Figuras 30 e 32), tem-se que o aumento da concentração de carreador promoveu efeito negativo sobre a recuperação do analito. Como já discutido anteriormente, o aumento da concentração do carreador promove aumento da viscosidade, o que dificulta o fluxo da fase doadora para a fase aceptora, porém baixas concentrações podem dificultar a formação do par iônico necessário para o aumento da recuperação. Por isso, optou-se por utilizar o valor de 10 % de Adogen 464, valor obtido para a condição ótima na qual a D_{total} é de 1 (Figura 33). Esta concentração de carreador iônico dissolvido em 1-octanol também foi utilizada por Bahrami et al. em 2018, que fez uso do Aliquat 336.

O tempo de extração é considerado um parâmetro muito importante para a eficiência da extração (BAHRAMI et al., 2017), sendo normalmente estabelecidos de 30 a 50 minutos para a realização do procedimento (ANDERSEN et al., 2002). Embora este tempo de extração seja relativamente longo quando comparado com o tempo de outras técnicas de extração (ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI , 2007), quando é levado em consideração que várias amostras são extraídas simultaneamente, este parâmetro deixa de ser uma desvantagem para a HF-LPME. Ao observar a Figura 33, constatou-se que a recuperação permaneceu estável a partir do tempo de 40 minutos. Desta forma, optou-se por manter este intervalo de tempo para a etapa da validação, pois tempos de extração superiores ao necessário para atingir o equilíbrio podem acarretar em perdas do solvente orgânico presente nos poros da fibra ou da fase aceptora e podem também resultar em diminuição da recuperação (BAHRAMI et al., 2018; GHAMARI et al., 2016).

Figura 33 - Gráfico de desejabilidade para a recuperação do FLU



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa Statistica®.

A condição para determinação do FLU em amostras de plasma está descrita na Tabela 31. O plasma foi diluído em 4,5 mL de solução de NaOH, pH 13,5, saturada com Na_2SO_4 e após a centrifugação, o volume de 3,5 mL de amostra foi transferido para o tubo de extração devido a precipitação de material no fundo do tubo. Esta etapa de diluição da amostra é importante, pois permite o ajuste do pH, a precipitação de proteínas plasmáticas e a diminuição da viscosidade da amostra, o que favorece o processo de extração. Segundo Basheer, Lee e Obbard (2004) a diluição promove a redução do bloqueio dos poros da fibra por sustâncias interferentes, promovendo melhoras na precisão, no rendimento da extração e diminuição do limite de detecção.

Ressalta-se que entre as vantagens do método desenvolvido estão o baixo volume de solvente orgânico utilizado, a agitação simultânea de 36 tubos, sem a necessidade de agitação por barra magnética, a qual pode ser uma fonte de contaminação da amostra (ALSHARIF et al., 2017) e a eliminação da precipitação das proteínas do plasma por solvente, recurso utilizado em alguns trabalhos encontrados na literatura utilizando a HF-LPME. Hadi, Makahleh e Saad (2012) fizeram uso de éter etílico, Ebrahimzadeh et al. (2011) e Ben-Hander et al. (2015) realizaram a etapa prévia de preparo do plasma com acetonitrila e

Hadjmohammadi e Ghambari (2012) optaram por utilizar metanol. O volume comumente utilizado para esse processo é de 3 mL. Outro elemento a ser enfatizado é o aumento da recuperação do FLU com a otimização do método, dado que a recuperação inicial obtida foi de cerca de 0,26 % para a HF-LPME de três fases mediada por carreador e o valor obtido pela otimização dos parâmetros foi de 12 %.

Tabela 31 - Condições estabelecidas para a análise do FLU em amostras de plasma por HF-LPME

	Condições estabelecidas	
HF-LPME	Volume de amostra biológica	500 µL
	Volume de NaOH pH = 13,5, saturado com Na_2SO_4	4,5 mL
	Centrifugação	2200 *g* por 15 min a 4 ºC
	Volume transferido para tubo de extração	3,5 mL
	Solvente orgânico para impregnação da fibra	1-octanol
	Tempo de impregnação da fibra	15 s
	Tempo de lavagem da fibra com água	5 s
	Proporção de Adogen 464	10 %
	Volume de fase aceptora adicionada	60 µL
	Concentração de NaCl na fase aceptora	1 $mol.L^{-1}$
	Velocidade de agitação	1000 rpm
	Tempo de extração	40 min
	Volume de fase aceptora coletada	50 µL
	Volume final da amostra	130 µL
HPLC	Coluna	Ascentis® Express C 18
	Temperatura	45 ºC
	Vazão	0,8 $mL.min^{-1}$
	Fase móvel (proporção, v/v)	etanol:água (12,5:87,5)
	Volume de injeção	25 µL
	Comprimento de onda	210 nm

A seleção de um IS para o método apresentou como dificuldade encontrar compostos com características físico-químicas semelhantes ao FLU e estabilidade adequada. Foram avaliados a fenacetina e o benzoato de metila, porém, baixa recuperação foi obtida nas condições estabelecidas. Além disso, a recuperação da fenacetina, única cujo pico foi visualizado no cromatograma, apresentou alto valor de CV, o que tornou seu uso dispensável no método. Acredita-se que esta dificuldade também foi encontrada em outros estudos que

fizeram uso da HF-LPME mediada por carreador, pois nos trabalhos de Ebrahimzadeh et al. (2011, 2012), Esrafili et al. (2012) e Zargar, Parham e Hatamie (2016) também não foi citado o uso de IS.

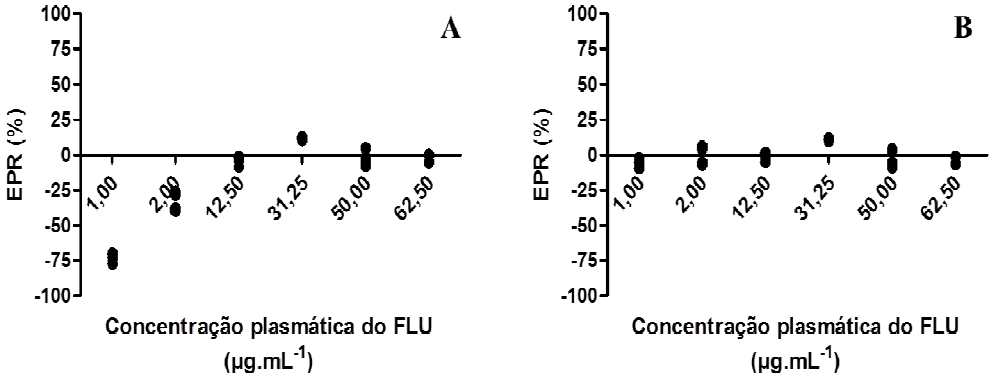
4.4.4 Validação do método

Para a validação do método foram utilizadas as condições descritas na Tabela 31.

4.4.4.1 Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram utilizados seis níveis de concentração compreendendo o intervalo entre 1,00 e 62,50 $\mu g.mL^{-1}$. Ao utilizar o modelo de regressão linear dos mínimos quadrados foi observado que, embora este modelo tenha apresentado coeficiente de correlação de 0,9960, os erros padrões relativos obtidos para as menores concentrações ultrapassavam o valor limite recomendado pelos guias (Figura 34). Por esta razão, foram avaliados modelos de regressão ponderada com os pesos $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$ (Tabela 32), sendo selecionado o ajuste da regressão linear com peso $1/x$, o qual apresentou menor valor de Σ ERP (%).

Figura 34 - Porcentagem de erro padrão relativo versus concentração plasmática do FLU para (A) modelo de regressão linear não ponderado e (B) modelo de regressão ponderado com peso 1/x



Fonte: elaborada pelo autor utilizando o programa GraphPad Prism 5.

Tabela 32 - Parâmetros das curvas de calibração e soma dos EPRs para os pesos de ponderação avaliados (n = 30)

Peso	Coeficiente linear (b)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente de correlação (r)	Σ EPR (%)[a]
1[b]	6103	10898	0,9960	-484
1/x	-1539	11186	0,9979	0
$1/x^2$	-2186	11364	0,9978	0
$1/x^{1/2}$	139	11079	0,9973	-96
1/y	-1590	11144	0,9980	15
$1/y^2$	-2144	11276	0,9980	20
$1/y^{1/2}$	-25	11063	0,9974	-79

[a] Σ EPR (%) - soma das exatidões de todas as análises realizadas para a curva de calibração, expressa em porcentagem
[b] regressão linear pelo método dos mínimos quadrados não ponderada

Também foi realizada a análise de variância do modelo (ANOVA), a qual apresentou valor de F_{calc} (4357275) muito superior ao $F_{tab(1;28;0,05)} = 4,18$ e valor de $p < 0,05$ (Tabela 33). Quando o modelo apresenta F_{calc} maior que o F_{tab} e $p < 0,05$ a hipótese nula é rejeitada, ou seja, o modelo de regressão é aceito. No entanto, devido à soma dos resíduos ser muito baixa, com valor de $-2,5.10^{-14}$, o cálculo da falta de ajuste não pode ser realizado.

Tabela 33 - ANOVA para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado, com nível de significância $p = 0,05$

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calc	F tab	Valor de *p*
Regressão	$4,69.10^{12}$	1	$4,69.10^{12}$	4357275,39	4,18	0,00
Resíduos	$3,12.10^{7}$	29	$1,08.10^{6}$	-	-	-

4.4.4.2 LIQ

O LIQ foi analisado em quintuplicata em amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 1,00 µg.mL^{-1}. A concentração obtida foi de 0,97 µg.mL^{-1}, com precisão e exatidão de 8,0 % e -2,7 %, respectivamente. Os valores obtidos estão em conformidade com os limites estabelecidos para métodos bioanalíticos, que admite valores de LIQ com exatidão e precisão inferiores a 20 % em relação ao valor nominal (ANVISA, 2012).

Na literatura são encontrados estudos com o FLU apresentando LIQ inferiores ao obtido neste método, mesmo utilizando quantidades inferiores a 0,5 mL de amostra biológica. Salienta-se que, embora esses trabalhos apresentem valores de LIQ menores que os estabelecidos neste trabalho, são utilizadas técnicas de extração convencionais, que fazem uso de grandes quantidades de solventes orgânicos.

4.4.4.3 Precisão

A precisão intracorrida foi obtida para cinco níveis de concentração em quintuplicata e a precisão intercorridas foi avaliada em três dias diferentes pela realização de quintuplicatas para os mesmos níveis de concentração. Na Tabela 34 pode-se observar os valores das concentrações obtidas e das precisões. A precisão variou de 0,8 a 11,2 %, mantendo-se abaixo do valor de 15 % recomendado pelos guias tanto para a precisão intracorrida como para a precisão intercorridas (ANVISA, 2012).

Tabela 34 - Precisão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em plasma

	Dia	**FLU**				
Concentração nominal ($\mu g.mL^{-1}$)		**1,00**	**2,00**	**31,25**	**50,00**	**62,50**
INTRACORRIDA						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)	Dia 1	0,95	2,01	34,64	48,83	60,39
	Dia 2	0,97	2,04	28,88	52,92	61,32
	Dia 3	1,00	2,06	30,79	52,97	60,50
Precisão (CV, %)[a]	Dia 1	3,1	6,1	0,8	5,6	2,9
	Dia 2	11,2	7,8	3,6	5,4	3,7
	Dia 3	8,3	3,6	4,6	2,8	4,3
INTERCORRIDAS						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)		0,97	2,04	31,43	51,57	60,74
Precisão (CV, %)[a]		8,0	5,7	8,4	`5,9	3,5

[a] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem.

4.4.4.4 Exatidão

A exatidão foi calculada utilizando-se as médias obtidas para as concentrações analisadas. Para os estudos de exatidão intracorrida foi utilizada média de uma quintuplicata e nos estudos intercorridas foram utilizados os valores de quintuplicatas de três dias. Os valores obtidos são inferiores a 11 % e estão expostos na Tabela 35.

Tabela 35 - Exatidão intracorrida e intercorridas do método para a análise do FLU em plasma

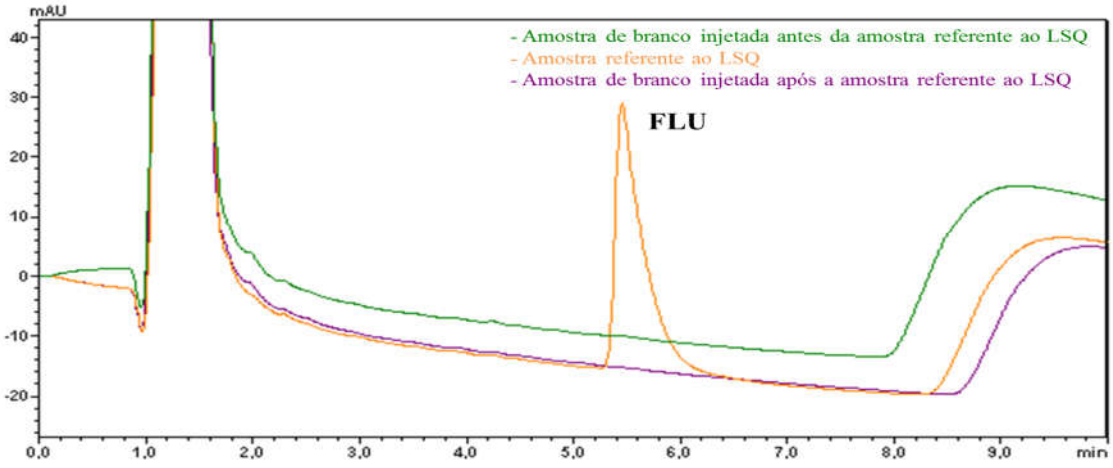
	Dia	**FLU**				
Concentração nominal ($\mu g.mL^{-1}$)		**1,00**	**2,00**	**31,25**	**50,00**	**62,50**
INTRACORRIDA						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)	Dia 1	0,95	2,01	34,64	48,83	60,39
	Dia 2	0,97	2,04	28,88	52,92	61,32
	Dia 3	1,00	2,06	30,79	52,97	60,50
EPR (%)[a]	Dia 1	-5,1	0,5	10,8	-2,3	-3,4
	Dia 2	-3,3	1,9	-7,6	5,8	-1,9
	Dia 3	0,2	3,1	-1,5	5,9	-3,2
INTERCORRIDAS						
Concentração analisada ($\mu g.mL^{-1}$)		0,97	2,04	31,43	51,57	60,74
EPR (%) [a]		-2,7	1,8	0,6	3,1	-2,8

[a]EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

4.4.4.5 Efeito residual

Não foi identificado efeito residual no método desenvolvido. As amostras não fortificadas (branco) injetadas antes e após a amostra referente ao LSQ apresentaram o mesmo perfil cromatográfico e não apresentaram picos em tempo próximo ao do FLU, como pode ser observado na Figura 35. Além disso, cada fibra foi utilizada uma única vez, o que contribuiu para a ausência de efeito residual (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011).

Figura 35 - Cromatogramas referentes à análise de amostras de branco de plasma e de uma amostra de plasma fortificada (LSQ)



Condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: etanol:água (12,5:87,5, v/v), temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$ e detecção em 210 nm.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.3.1.1.

4.4.4.6 Seletividade

Os cromatogramas obtidos de seis amostras de plasma, sendo uma lipêmica, uma hemolisada e quatro normais quando comparados com os cromatogramas obtidos para o LIQ, apresentaram sinais analíticos em tempo inferior a 5 minutos, de modo que não há comprometimento da análise, já que o tempo de retenção do FLU é de 5,8 minutos (CV = 1,4 %, n = 30), corroborando o fato de a HF-LPME oferecer alta seletividade **(**FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; YUDTHAVORASIT; CHIAOCHAN; LEEPIPATPIBOON, 2011) e ótima remoção dos interferentes presentes em matrizes complexas (BASHEER; LEE; OBBARD, 2004).

4.4.4.7 Recuperação

A recuperação obtida para o FLU foi de 12 % (CV = 13,8 %). Embora seja um valor baixo de recuperação, foi possível desenvolver um método com LIQ de 1 $\mu g.mL^{-1}$ e, segundo Peters, Drummer e Musshoff (2007), contanto que a recuperação permita que os dados tenham precisão, exatidão e LIQ adequados para seu uso, o valor obtido de recuperação não é importante. Além disso, tem-se que muitas vezes quando amostras de plasma são comparadas com amostras de água, a recuperação utilizando a HF-LPME é menor para as amostras biológicas. Recuperações de 10 e 16 % foram obtidas para os compostos atenolol e ranitidina, respectivamente, ambas com o uso da HF-LPME com octanoato de sódio como carreador iônico e volumes de amostras de 100 µL de plasma (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). Portanto, acredita-se que como a HF-LPME com o uso de carreadores iônicos pode ter sua recuperação aumentada pela diminuição da razão entre volume de amostra e volume de fase aceptora, a recuperação obtida neste estudo poderia ser melhorada com a redução da quantidade de solução de NaOH adicionada ao plasma, pelo uso de tubos de menor volume. Além disso, destaca-se que recuperações de 17 a 32 % foram alcançadas para os antifúngicos cetoconazol, clotrimazol e miconazol quando a HF-LPME foi utilizada para análise de amostras de água, urina e plasma (MORADI et al., 2010), portanto, os valores obtidos de recuperação neste trabalho são adequados.

4.4.4.8 Estudos de estabilidade do fármaco em plasma

A diminuição da concentração do analito na amostra pode ocorrer por instabilidade metabólica (própria da matriz biológica), química (inerente das características físico-químicas do composto), por precipitação ou por ligações não covalentes com os componentes da matriz ou do recipiente plástico na qual possa estar armazenada (REED, 2016). Portanto, a realização

de estudos de estabilidade se faz necessária para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Os estudos de estabilidade de curta duração, longa duração, pós-processamento e após ciclos de congelamento e descongelamento foram realizados em quadruplicata para as concentrações referentes ao CB e ao CA. Todas as amostras analisadas apresentaram desvio inferior a 9 % em relação ao valor nominal, sendo, portanto, consideradas estáveis nas condições analisadas (Tabela 36).

Tabela 36 - Estudos de estabilidade para o FLU em plasma e em solução de análise

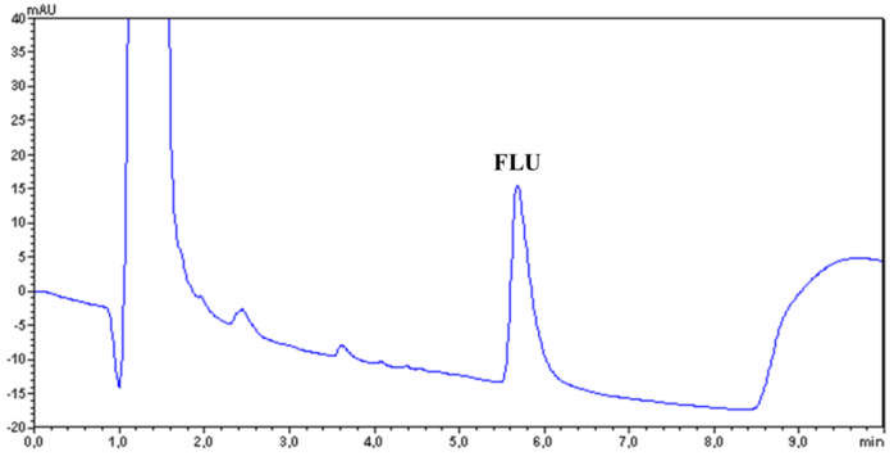
	CB - 2,0 µg.mL^{-1}			**CA - 50,0 µg.mL^{-1}**		
	Concentração obtida (µg.mL^{-1})	**Precisão CV (%)[b]**	**Exatidão EPR (%)[c]**	**Concentração obtida (µg.mL^{-1})**	**Precisão CV (%)[b]**	**Exatidão EPR (%)[c]**
Estabilidade após ciclos [a]	2,0	4,1	-2,1	50,8	3,0	1,7
Estabilidade de curta duração[a]	1,8	8,2	-9,0	48,7	4,3	-2,6
Estabilidade de longa duração[a]	2,1	6,6	4,9	48,6	1,4	-2,9
Estabilidade pós-processamento[a]	1,8	9,1	-8,6	45,7	5,7	-8,6

[a] n = 4, n = número de replicatas de amostras submetidas aos estudos de estabilidade
[b] CV = coeficiente de variação, expresso em porcentagem
[c] EPR = erro padrão relativo, expresso em porcentagem.

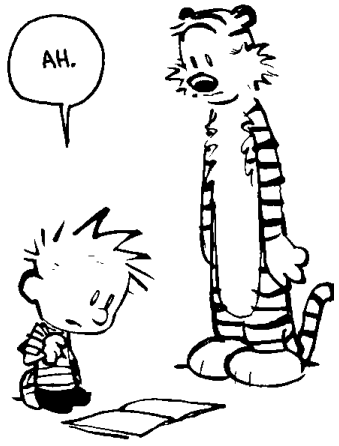
4.4.4.9 Determinação da concentração de FLU em amostra de plasma de paciente em tratamento

Schiave et al. (2018) ao analisar as concentrações no soro de pacientes realizando tratamento com o FLU no intervalo de dosagem de 200 a 800 mg diários identificou valores de 7,5 a 60,5 µg.mL^{-1}, o que demonstra que o intervalo de concentração estabelecido para o método desenvolvido está adequado para a finalidade proposta. Desta forma, foram analisadas duas amostras de plasma de um mesmo paciente, com intervalo de sete dias entre as coletas, sendo obtidas concentrações de 35,53 µg.mL^{-1} (Figura 36) e 31,11 µg.mL^{-1}.

Figura 36 - Cromatograma referente à análise de uma amostra de plasma de paciente em tratamento com o FLU



Condições cromatográficas: coluna Ascentis® Express C 18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e coluna de guarda Ascentis® Express C18 (3 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: etanol:água (12,5:87,5, v/v), temperatura de 45 ºC, vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$ e detecção em 210 nm.
Fonte: obtida pelo autor, através do equipamento do item 3.3.1.1.



(WATERSON, 2010b)

4.5 CONCLUSÕES

4.5 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e validado um método para a quantificação do FLU em amostras de plasma utilizando a HF-LPME mediada por carreador associada à técnica de HPLC-PDA.

A análise por HLPC apresentou tempo inferior a 10 minutos e fez uso de etanol para composição da fase móvel, que apesar de apresentar maior viscosidade que os solventes normalmente utilizados, é considerado um solvente ecologicamente correto.

Na etapa referente à HF-LPME, quantidade mínima de solvente orgânico foi necessária, apenas para a impregnação da fibra, já que na etapa de precipitação de proteínas foi utilizado o sulfato de sódio.

A contaminação entre as amostras foi eliminada do procedimento, pois cada fibra foi utilizada uma única vez e a agitação foi realizada sem a necessidade de barra magnética. Outra vantagem destacada pelo uso da fibra foi a presença de uma estrutura porosa entre as fases, que permitiu alta seletividade e remoção dos interferentes do plasma.

O uso do FFD e do CCD para a otimização dos parâmetros que influenciam na microextração possibilitou a obtenção de uma equação para predizer a recuperação em função das variáveis estudadas e para determinação das condições na qual a eficiência da extração é máxima.

A validação do método possibilitou a análise de amostras de pacientes e enquadrou-se dentro dos valores estabelecidos pela ANVISA (2012) e pelo EMA (2011) e embora a recuperação média obtida para o FLU foi de 12 %, mostrou-se adequada para a obtenção de uma curva analítica com concentração entre 1,0 e 62,5 $\mu g.mL^{-1}$.

Por fim, conclui-se que a maior vantagem do método desenvolvido em relação aos métodos já existentes é a redução do consumo de solventes. Além disso, a HF-LPME nunca tinha sido anteriormente utilizada para a quantificação do FLU em nenhum tipo de matriz e é uma microextração muito vantajosa para amostras como o plasma, pois apresenta alta remoção de interferentes.

(WATERSON, 2008)

5 CONCLUSÕES GERAIS

5 CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos para a análise do FLU em amostras biológicas de plasma e CSF utilizando técnicas de microextrações em fase líquida.

As condições de quantificação do FLU por HPLC-PDA basearam-se em análises cromatográficas rápidas e fizeram uso de etanol, solvente obtido de fontes renováveis.

O método desenvolvido para análise de FLU em amostras de CSF fez uso da DLLME como técnica de extração e, para análise da influência das variáveis sobre a recuperação do FLU, foram utilizados os delineamentos FFD e CCD. Desta forma, foram obtidas equações para o modelo capazes de estabelecer a relação entre as variáveis e a resposta desejada e a condição final estabelecida para a extração envolveu o uso de baixo volume de solvente orgânico e apenas 200 μL de CSF, sendo obtidas recuperações de 70 % para o FLU e 81 % para o IS. Ademais, recuperação de cerca de 97 % para o FLU poderia ter sido obtida se a condição de $D_{total} = 1$ fosse utilizada com o inconveniente de, neste caso, utilizar um alto volume de solvente extrator. A validação do método foi realizada abordando os parâmetros: curva de calibração, precisão, exatidão, efeito residual, seletividade e estudos de estabilidade do analito na matriz biológica e em solução e apresentou conformidade com os limites estabelecidos pelos guias utilizados.

Já o método para análise do FLU em amostras de plasma foi realizado utilizando a HF-LPME de três fases mediada por carreador, já que o FLU é um fármaco com log P baixo. Para a otimização da técnica também foram utilizados os delineamentos FFD e CCD para a análise da influência de oito e três fatores, respectivamente. Uma recuperação de 12 % para o FLU foi obtida utilizando-se 500 μL de amostra e a remoção dos interferentes do plasma pelo uso da fibra de polipropileno constitui uma contribuição relevante, pois muitos fármacos podem ser administrados aos pacientes acometidos por neuromicoses. Os mesmos parâmetros de validação utilizados para o método utilizando CSF foram utilizados nesta etapa e os valores obtidos garantem a confiabilidade do método desenvolvido.

Curvas de calibração com linearidades para o intervalo de 0,25 a 62,50 $\mu g.mL^{-1}$ e 1,0 a 62,5 $\mu g.mL^{-1}$ foram obtidas utilizando um modelo de regressão ponderado com peso 1/x para a quantificação do CSF e do plasma, respectivamente. A alta recuperação obtida pela DLLME permitiu que o LIQ para o método desenvolvido para análise de CSF fosse menor que o LIQ obtido para a análise de plasma, mesmo utilizando menor volume de amostra biológica.

As análises das amostras de paciente em tratamento com o FLU resultaram em concentrações do fármaco no CSF de 45,29 e 41,71 $\mu g.mL^{-1}$ e em concentrações plasmáticas

de 35,53 e 31,11 $\mu g.mL^{-1}$, de modo que o intervalo estabelecido para a curva de calibração mostrou-se adequado para a análise proposta e não foram observados picos de interferentes nos cromatogramas em tempo de retenção próximo ao do analito de interesse.

Considerando que os métodos descritos na literatura fazem uso de técnicas de extração convencionais como a LLE e a SPE e usam alto volume de solventes orgânicos para a precipitação de proteínas ou para a extração do FLU, o desenvolvimento de métodos utilizando microextrações representa um relevante avanço para a redução da geração de resíduos. Soma-se a essa vantagem o uso de delineamentos experimentais para a determinação das condições de extração, cujo uso tem crescido consideravelmente e que até o momento não foram utilizados para a otimização das extrações do FLU de amostras biológicas.

Desta forma, acredita-se que os métodos desenvolvidos neste estudo contribuem para o monitoramento terapêutico do FLU, pois são fáceis de serem executados, de baixo custo e reduzem a exposição dos analistas a solventes considerados nocivos a saúde humana.

(WATERSON, 2009b)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 10 out. 2017.

AGUIRRE, M. A. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for metals enrichment: a useful strategy for improving sensitivity of laser-induced breakdown spectroscopy in liquid samples analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 131, p. 348-353, 2015. ISSN 0039-9140.

AHMADI-JOUIBARI, T.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 94, p. 145-151, 2014. ISSN 0731-7085.

AL AZZAM, K. M. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace amounts of rosiglitazone (anti-diabetic drug) in biological fluids using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 23, p. 3654-3659, 2010. ISSN 0021-9673.

ALCANTARA, G. K. S. et al. Determination of levetiracetam in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Cario, v. 2016, ID 5976324, 2016. ISSN 2090-8865.

ALFFENAAR, J. W. C. et al. Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 878, n. 1, p. 39-44, 2010. ISSN 1570-0232.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002. ISSN 1570-0232.

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: a review. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 378-391, 2017. ISSN 0021-9665.

ANAISSIE, E. J. et al. Safety, plasma-concentrations, and efficacy of high-dose fluconazole in invasive mold infections. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 2, p. 599-602, 1995. ISSN 0022-1899.

ANDERSEN, S. et al. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **Journal of**

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Chromatography A, Amsterdam, v. 963, n. 1-2, p. 303-312, 2002. ISSN 0021-9673.

ANDRUCH, V. et al. Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, New York, v. 100, p. 77-82, 2012. ISSN 0026-265X.

ARCE, L. et al. Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 842-853, 2009. ISSN 0165-9936.

BAENA, Y. et al. Temperature-dependence of the solubility of some acetanilide derivatives in several organic and aqueous solvents. **Physics and Chemistry of Liquids**, New York, v. 42, n. 6, p. 603-613, 2004. ISSN 0031-9104.

BAFELTOWSKA, J. J.; BUSZMAN, E. Pharmacokinetics of fluconazole in the cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. **Chemotherapy**, Basel, v. 51, n. 6, p. 370-376, 2005. ISSN 0009-3157.

BAHRAMI, A. et al. Ion-pair-based hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of urinary benzene, toluene, and styrene metabolites. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 41, n. 2, p. 501-508, 2018. ISSN 1615-9306.

_____. Hollow fiber supported liquid membrane extraction combined with hplc-uv for simultaneous preconcentration and determination of urinary hippuric acid and mandelic acid. **Membranes**, Basel, v. 7, n. 1, 2017. ISSN 2077-0375.

BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. development and validation of an hplc method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2009. ISSN 0910-6340.

BARDSTU, K. F. et al. Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME) - practical considerations in the three-phase mode. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 9, p. 1364-1370, 2007. ISSN 1615-9306.

BARROS, L. S. R. et al. A three phase hollow fiber liquid-phase microextraction for quantification of lamotrigine in plasma of epileptic patients by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 37, n. 20, p. 2678-2684, 2016. ISSN 0173-0835.

BASHEER, C.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Application of liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in blood plasma. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1022, n. 1-2, p. 161-169, 2004. ISSN 0021-9673.

BASU, S. S. et al. A rapid UPLC-MS/MS assay for the simultaneous measurement of fluconazole, voriconazole, posaconazole, itraconazole, and hydroxyitraconazole concentrations in serum. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 55, n. 6, p. 836-844, 2017. ISSN 1434-6621.

BEIJNEN, J. H. et al. Gas-chromatographic analysis, with electron-capture detection, of the antifungal drug fluconazole in microvolumes of human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 9, n. 10-12, p. 1173-1175, 1991. ISSN 0731-7085.

BELAL, F. et al. Micellar HPLC and derivative spectrophotometric methods for the simultaneous determination of fluconazole and tinidazole in pharmaceuticals and biological fluids. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 298-309, 2014. ISSN 0021-9665.

BELLO-LOPEZ, M. A. et al. Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 45, n. 8, p. 804-830, 2012. ISSN 0003-2719.

BEN-HANDER, G. M. et al. Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids. **Talanta**, Amsterdam, v. 131, p. 590-596, 2015. ISSN 0039-9140.

BERIJANI, S. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection - very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1123, n. 1, p. 1-9, 2006. ISSN 0021-9673.

BESTE, K. Y.; BURKHARDT, O.; KAEVER, V. Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 413, n. 1-2, p. 240-245, 2012. ISSN 0009-8981.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, Amsterdam, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008. ISSN 0039-9140.

BHARATHI, D. V. et al. Development and validation of a highly sensitive and robust LC-MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma: application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 868, n. 1-2, p. 70-76, 2008. ISSN 1570-0232.

BIANCHI, F.; CARERI, M. Experimental design techniques for optimization of analytical methods. Part I: Separation and sample preparation techniques. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 4, n. 1, p. 55-74, 2008. ISSN 1573-4110.

BORGES, K. B. et al. Box-Behnken design for the optimization of an enantioselective method for the simultaneous analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 30, n. 16, p. 2874-2881, 2009. ISSN 0173-0835.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters**: design, innovation and discovery. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005.

BRAMMER, K. W. et al. The disposition and metabolism of [C-14] fluconazole in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 19, n. 4, p. 764-767, 1991. ISSN 0090-9556.

CAI, K. et al. Determination of carbohydrates in tobacco by pressurized liquid extraction combined with a novel ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 882, p. 90-100, 2015. ISSN 0003-2670.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 665, n. 1, p. 55-62, 2010. ISSN 0003-2670.

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, Amsterdam, v. 124, p. 123-138, 2014. ISSN 0039-9140.

CARRASCO-PORTUGAL, M. C.; FLORES-MURRIETA, F. J. Gender differences in the oral pharmacokinetics of Fluconazole. **Clinical Drug Investigation**, Auckland, v. 27, n. 12, p. 851-855, 2007. ISSN 1173-2563.

CASSIANO, N. M. et al. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009. ISSN 0100-4042.

CHAHBOUNI, A. et al. Validated liquid chromatography-tandem mass spectroscopy method for the simultaneous quantification of four antimycotic agents in human serum. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 32, n. 4, p. 453-457, 2010. ISSN 0163-4356.

CHAIEB, N. et al. Hollow fibre liquid phase micro-extraction by facilitated anionic exchange for the determination of flavonoids in faba beans (Vicia faba L.). **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 26, n. 5, p. 346-352, 2015. ISSN 0958-0344.

COCIGLIO, M. et al. High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma. **Journal of Chromatography B - Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 686, n. 1, p. 11-17, 1996. ISSN 0378-4347.

CORRÊA, J. C. R. et al. Stability study of fluconazole applying validated bioassay and stability-indicating LC methods. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, Sunnyvale, v. 2, n. 5, ID 1000126, 2011. ISSN: 2155-9872.

CORRÊA, J. C. R.; REICHMAN, C.; SALGADO, H. R. N. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative uv spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 530-534, 2012. ISSN 0100-4042.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 41, n. 2, p. 124-132, 2011. ISSN 1040-8347.

COUSIN, L. et al. Dosing guidelines for fluconazole in patients with renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 2227-2231, 2003. ISSN 0931-0509.

CUI, S. et al. The mass transfer dynamics of hollow fiber liquid-phase microextraction and its application for rapid analysis of biological samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1266, p. 10-16, 2012. ISSN 0021-9673.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Liquid-phase microextraction (LPME): Fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008. ISSN 0100-4042.

DE SOUSA, C. E. M. et al. High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma and its application to a bioequivalence study. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 30, n. 7, p. 1432-1436, 2011. ISSN 0326-2383.

DECOSTERD, L. A. et al. multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-n-oxide, anidulafungin, and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 12, p. 5303-5315, 2010. ISSN 0066-4804.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011. ISSN 0731-7085.

DUNN, T. A.; STORM, D. R.; FELLER, M. B. Calcium-dependent increases in protein kinase-A activity in mouse retinal ganglion cells are mediated by multiple adenylate cyclases. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 11, p. e7877, 2009. ISSN 1932-6203.

EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Extraction of azole antifungal drugs from milk and biological fluids using a new hollow fiber liquid-phase microextraction and analysis by GC-FID. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 74, n. 3-4, p. 281-289, 2011. ISSN 0009-5893.

EBRAHIMZADEH, H. et al. Optimization of carrier-mediated three-phase hollow fiber microextraction combined with HPLC-UV for determination of propylthiouracil in biological samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 1043-1049, 2011. ISSN 0039-9140.

_____. Simultaneous determination of chloropheniramine maleate and dextromethorphan hydrobromide in plasma sample by hollow fiber liquid phase microextraction and high performance liquid chromatography with the aid of chemometrics. **Talanta**, Amsterdam, v. 94, p. 77-83, 2012. ISSN 0039-9140.

EERKES, A.; SHOU, W. Z.; NAIDONG, W. Liquid/liquid extraction using 96-well plate format in conjunction with hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of fluconazole in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2003. ISSN 0731-7085.

EGLE, H.; TRITTLER, R.; KUMMERER, K. A new, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 26, n. 4, p. 425-431, 2004. ISSN 0163-4356.

EKIERT, R. J.; KRZEK, J.; TALIK, P. Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents-a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 1090-1100, 2010. ISSN 0039-9140.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 10 out. 2017.

EMIDIO, E. S.; DA SILVA, C. P.; DE MARCHI, M. R. R. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1391, p. 1-8, 2015. ISSN 0021-9673.

EMIDIO, E. S. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 878, n. 24, p. 2175-2183, 2010. ISSN 1570-0232.

ESRAFILI, A. et al. Measurement of fluoroquinolone antibiotics from human plasma using hollow fiber liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 35, n. 1-4, p. 343-354, 2012. ISSN 1082-6076.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007. ISSN 0003-2670.

FARAJZADEH, M. A.; ASSADI, A. Liquid-gas-liquid technique for microextraction and preconcentration of short chain fatty acids from aqueous samples. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, n. 7, p. 1027-1035, 2009. ISSN 1615-9306.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D.; BAKHTIYARI, R. F. Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid-liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography-Flame ionization detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, n. 4-5, p. 1360-1367, 2010. ISSN 0039-9140.

FERNANDEZ, P. et al. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 35, n. 4, p. 418-425, 2015. ISSN 0260-437X.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007a. ISSN 0003-2670.

_____. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007b. ISSN 0021-9673.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review. **Talanta**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004. ISSN 0039-9140.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 1043, p. 44-62, 2017. ISSN 1570-0232.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry**: bioanalytical method validation. 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf >. Acesso em: 06 dez. 2017.

FORTES, S. S. et al. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction in the stereoselective determination of cetirizine following the fungal biotransformation of hydroxyzine and analysis by capillary electrophoresis. **Talanta**, Amsterdam, v. 116, p. 743-752, 2013. ISSN 0039-9140.

FOTOUHI, L. et al. Comparison of conventional hollow fiber based liquid phase microextraction and electromembrane extraction efficiencies for the extraction of ephedrine from biological fluids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 48, p. 8581-8586, 2011. ISSN 0021-9673.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 50, p. 78-84, 2013. ISSN 0165-9936.

GHAEDI, M. et al. Application of optimized vortex-assisted surfactant-enhanced dllme for preconcentration of thymol and carvacrol, and their determination by hplc-uv: response surface methodology. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 53, n. 7, p. 1222-1231, 2015. ISSN 0021-9665.

GHAMARI, F. et al. Development of hollow-fiber liquid-phase microextraction method for determination of urinary trans, trans-muconic acid as a biomarker of benzene exposure. **Analytical Chemistry Insights**, Thousand Oaks, v. 11, p. 65-71, 2016. ISSN 1177-3901.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. **Microchimica Acta**, Wien, v. 177, n. 3-4, p. 271-294, 2012. ISSN 0026-3672.

GIACOMINO, A. et al. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A Review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 688, n. 2, p. 122-139, 2011. ISSN 0003-2670.

GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, n. 3, p.181-189, 2013. ISSN 1984-4433.

GORDIEN, J. B. et al. Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical**

and Biomedical Analysis, London, v. 50, n. 5, p. 932-938, 2009. ISSN 0731-7085.

GROSS, A. S. et al. Simultaneous administration of a cocktail of markers to measure renal drug elimination pathways: absence of a pharmacokinetic interaction between fluconazole and sinistrin, p-aminohippuric acid and pindolol. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 547-555, 2001. ISSN 0306-5251.

GUAN, K.; PALMER, D. C. Effects of trifluoroacetic acid concentrations in mobile phases on HPLC retention of zwitterionic and weakly basic triazole derivatives. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 29, n. 3, p. 415-430, 2006. ISSN 1082-6076.

GUILHEN, S. N. et al. Validation of an analytical method for the determination of total mercury in urine samples using cold vapor atomic absorption spectrometry (CV-AAS). Case study. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1285-1290, 2010. ISSN 0100-4042.

HADI, H.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of trace mitiglinide in biological fluids. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 895, p. 131-136, 2012. ISSN 1570-0232.

HADJMOHAMMADI, M.; GHAMBARI, H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 61, p. 44-49, 2012. ISSN 0731-7085.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 760, n. 2, p. 219-226, 2001. ISSN 0378-4347.

HANRAHAN, G.; MONTES, R.; GOMEZ, F. A. Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 390, n. 1, p. 169-179, 2008. ISSN 1618-2642.

HANSSON, H.; NILSSON, U. Assessment of a dynamic hollow-fibre liquid phase microextraction system for human blood plasma samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 77, n. 4, p. 1309-1314, 2009. ISSN 0039-9140.

HARTMANN, C. et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 17, n. 2, p. 193-218, 1998. ISSN 0731-7085.

HERMAWAN, D. et al. Analysis of fluconazole in human urine sample by high performance liquid chromatography method. **2013 International Conference on Science & Engineering in Mathematics, Chemistry and Physics (Scietech 2013)**, Bristol, v. 423, 2013. ISSN 1742-6588.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**,

Amsterdam, v. 910, p. 2-13, 2012. ISSN 1570-0232.

HILLIS, J. et al. The validation of a bioanalytical method for the determination of fluconazole in human plasma. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 59, p. S203-S207, 2004. ISSN 0009-5893.

HO, T.S. et al. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 998, n. 1-2, p. 61-72, 2003. ISSN 0021-9673.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 308-316, 2006. ISSN 0021-9665.

HOU, L.; LEE, H. K. Dynamic three-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 11, p. 2784-2789, 2003. ISSN 0003-2700.

HOU, X. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 969, p. 123-127, 2014. ISSN 1570-0232.

HUO, X. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 2011. ISSN 0009-5893.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1996. ISSN 0003-2700.

JEBALIYA, H. et al. A comparative validation study of fluconazole by HPLC and UPLC with forced degradation study. **Chromatography Research International**, Cairo, v. 2013, ID 673150, 2013. ISSN 2090-3510.

JIA, S. et al. Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 86, p. 204-213, 2013. ISSN 0731-7085.

JOVANOVIC, D. et al. A randomized, open-label pharmacokinetic comparison of two oral formulations of fluconazole 150 mg in healthy adult volunteers. **Clinical Therapeutics**, Belle Mead, v. 27, n. 10, p. 1588-1595, 2005. ISSN 0149-2918.

KARIMI, M. et al. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction and improvement of detection limit of methyl tert-butyl ether in water with the aid of chemometrics. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 45, p. 7017-7023, 2010. ISSN 0021-9673.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with

the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 699, n. 1, p. 113-9, 2011. ISSN 1873-4324.

KIM, S. et al. An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performace liquid chromatgraphy with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 852, n. 1-2, p. 174-179, 2007. ISSN 1570-0232.

KOCÚROVÁ, L. et al. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal**, New York, v. 102, p. 11-17, 2012. ISSN 0026-265X.

KOHLER, I. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 73, p. 82-89, 2013. ISSN 0731-7085.

KOHLER, I.; SCHAPPLER, J.; RUDAZ, S. Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 1, p. 125-141, 2013. ISSN 1618-2642.

KOKS, C. H. W. et al. High-performance liquid-chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Chromatography B - Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 663, n. 2, p. 345-351, 1995. ISSN 0378-4347.

KUMAR, N. et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: an overview. **Talanta**, Amsterdam, v. 123, p. 186-199, 2014. ISSN 0039-9140.

KURBATOVA, S. V.; KHARITONOVA, O. V. Influence of eluent composition on the retention factor of Azoles in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Russian Journal of Applied Chemistry**, New York, v. 81, n. 3, p. 407-411, 2008. ISSN 1070-4272.

KURBATOVA, S. V.; KHARITONOVA, O. V.; FINKELSHTEIN, E. E. The retention of some azoles in reversed-phase liquid chromatography. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, London, v. 82, n. 11, p. 1932-1937, 2008. ISSN 0036-0244.

KURBATOVA, S. V.; PARSHIKOVA, O. V.; BELOUSOVA, Z. P. Correlation between the structure and chromatographic retention of some azole derivatives. **Russian Journal of Applied Chemistry**, New York, v. 81, n. 4, p. 651-656, 2008. ISSN 1070-4272.

LEE, J. et al. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 624, n. 2, p. 253-268, 2008. ISSN 0003-2670.

LEONG, M. I. et al. Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 34, p. 5455-5461, 2010. ISSN 0021-9673.

LEONG, M. I.; FUH, M. R.; HUANG, S. D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1335, p. 2-14, 2014. ISSN 0021-9673.

LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 86, n. 8, p. 805-817, 2011. ISSN 0025-6196.

LI, Y. et al. Optimization and validation of a MEKC method assisted by Box-Behnken design for fast and simultaneous determination of nitrendipine and atenolol in new antihypertensive combination tablets. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, n. 13, p. 3353-3364, 2013. ISSN 1759-9660. ,

LIANG, P.; SANG, H. Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 380, n. 1, p. 21-25, 2008. ISSN 0003-2697.

LIEW, K.B. et al. Development and application of simple HPLC-UV method for fluconazole quantification in human plasma. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Sagar, v. 4, p. 107-111, 2012. ISSN 0975-1491.

LIGIERO, C. B. P. et al. Comparison of quantification methods in gas chromatography: an experiment for chemistry courses. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009. ISSN 0100-4042.

LOPEZ-DARIAS, J. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, n. 5, p. 1611-1618, 2010. ISSN 0039-9140.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1998. ISSN 0169-7439.

LV, J. et al. Hollow fiber-based liquid membrane microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of trimetazidine in human plasma. **Biomedical Chromatography**, London, v. 27, n. 3, p. 292-298, 2013. ISSN 0269-3879.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 46, n. 5, p. 929-936, 2008. ISSN 0731-7085.

MAJCHERCZYK, P. A. et al. Single-step extraction of fluconazole from plasma by ultra-filtration for the measurement of its free concentration by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 28, n. 3-4, p. 645-651, 2002. ISSN 0731-7085.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006. ISSN 1806-3756.

MASHAYEKHI, H. A. et al. rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 71,

n. 5-6, p. 517-521, 2010. ISSN 0009-5893.

MASSART, D. L. et al. An introduction to experimental design. In: _____. **Data handling in science and technology**. Amsterdam: Elsevier, 1998. v. 20, cap. 21, p. 643-658. ISBN 0922-3487.

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

MCLACHLAN, A. J. et al. Analytical validation for a series of marker compounds used to assess renal drug elimination processes. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 23, n. 1, p. 39-46, 2001. ISSN 0163-4356.

MENG, L. et al. Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 1053, p. 9-15, 2017. ISSN 1570-0232.

_____. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International**, Limerick, v. 209, n. 1-3, p. 42-47, 2011. ISSN 0379-0738.

MERIB, J.; CASAREK, E. Supported liquid phase microextraction with hollow fiber (HF-LPME): fundamentals and recent applications. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, n. 4, p.249-262, 2013. ISSN 1984-4433.

MITCHELL, R. J. et al. The application of fully automated on-line solid phase extraction in bioanalysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 52, n. 1, p. 86-92, 2010. ISSN 0731-7085.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 1043, p. 3-11, 2017. ISSN 1570-0232.

MORADI, M. et al. Monitoring of trace amounts of some anti-fungal drugs in biological fluids by hollow fiber based liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 387-392, 2010. ISSN 1759-9660.

MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHERI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 34, n. 14, p. 1722-1729, 2011. ISSN 1615-9306.

MORAES, L. A. et al. Fluconazole bioequivalence study: Quantification by tandem mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 21, n. 2, p. 200-207, 1999. ISSN 0163-4356.

MOREIRA, B. J. et al. Analysis of oxybutynin and N-desethyloxybutynin in human urine by

dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and capillary electrophoresis (CE). **Analytical Methods**, Cambridge, v. 7, n. 20, p. 8763-8770, 2015. ISSN 1759-9660.

MORITA, A.; ISHIHARA, M.; KONNO, M. [Dementia in patients with central nervous system mycosis]. **Brain and Nerve**, Tokyo, v. 68, n. 4, p. 329-39, 2016. ISSN 1881-6096.

NCUBE, S. et al. Multivariate optimization of the hollow fibre liquid phase microextraction of muscimol in human urine samples. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 1033, p. 372-381, 2016. ISSN 1570-0232.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 905, p. 8-23, 2016. ISSN 0003-2670.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: a review. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 69, n. 11-12, p. 1149-1159, 2009. ISSN 0009-5893.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 87, p. 290-307, 2014. ISSN 0731-7085.

PAI, N. R.; DUBHASHI, D. S. Development of a validated stability indicating lc method for quantitative determination of an antispasmodic drug and its related substances. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 33, n. 14, p. 1359-1368, 2010. ISSN 1082-6076.

PANAGIOTOU, A. N.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Application of chemometric assisted dispersive liquid-liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, n. 2, p. 135-140, 2009. ISSN 0003-2670.

PARRIS, N. A. Nature of the mobile phase. In: _____. **Journal of Chromatography Library**. Amsterdam: Elsevier, 1984. v. 27, cap. 7, p. 135-174. ISBN 0301-4770.

PAYÁN, M. R. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 55, n. 2, p. 332-341, 2011. ISSN 0731-7085.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999. ISSN 0003-2700.

_____. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 817, n. 1, p. 3-12, 2005. ISSN 1570-0232.

_____. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly

flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, n. 1-2, p. 132-142, 2008. ISSN 0021-9673.

PENG, G. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction using low-toxic solvent for the determination of heavy metals in water samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 99, n. 1, p. 260-266, 2016. ISSN 1060-3271

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, Limerick, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, 2007. ISSN 0379-0738.

PIROOZI, F. et al. Hollor fiber liquid phase microextraction combined with high performance liquid ch-romatography for preconcentration and determination of cabergoline in biological samples**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 37, n. 5, p. 760-771, 2014. ISSN 1082-6076.

PORTA, V.; CHANG, K. H.; STORPIRTIS, S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, n. 1, p. 81-86, 2005. ISSN 0378-5173.

POURBASHEER, E. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of phenytoin in real samples using response surface methodology-high performance liquid chromatography. **Rsc Advances**, Cambridge, v. 4, n. 107, p. 62190-62196, 2014. ISSN 2046-2069.

PRABU S. L.; SURIYAPRAKASH, T. N. K.. Extraction of drug from the biological matrix: a review. In: Naik, G. R. **Applied Biological Engineering:** Principles and Practice, Rijeka: InTech, 2012. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/applied-biological-engineering-principlesand-practice/extraction-of-the-drug-from-the-biological-matrix. ISBN: 978-953-51-0412-4.

PROSEN, H. Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 5, p. 6776-6808, 2014. ISSN 1420-3049.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003. ISSN 0165-9936.

QU, L. et al. Utilizing online-dual-SPE-LC with HRMS for the simultaneous quantification of amphotericin B, fluconazole, and fluorocytosine in human plasma and cerebrospinal fluid. **Talanta**, Amsterdam, v. 165, p. 449-457, 2017. ISSN 0039-9140.

RAO, R. N.; RAJU, S. S.; VALI, R. M. Ionic-liquid based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 931, p. 174-180, 2013. ISSN 1570-0232.

RASMUSSEN, K. E. et al. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drag analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary

electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 873, n. 1, p. 3-11, 2000. ISSN 0021-9673.

REED, G. A. Stability of drugs, drug candidates, and metabolites in blood and plasma. **Current Protocols in Pharmacology**, New York, v. 75, p. 7.6.1-7.6.12, 2016. ISSN 1934-8290.

REGE, A. B. et al. Rapid and sensitive assay for fluconazole which uses gas-chromatography with electron-capture detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 36, n. 3, p. 647-650, 1992. ISSN 0066-4804.

REZAEE, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006. ISSN 0021-9673.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010. ISSN 0021-9673.

REZAEI, F. et al. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 158, n. 2-3, p. 621-627, 2008. ISSN 0304-3894.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. ISSN 0100-4042.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Validation spreadsheet: A new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008. ISSN 0100-4042.

RIBEIRO, R. L. V. et al. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 300-306, 2004. ISSN 0103-5053.

ROZET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 55, n. 4, p. 848-858, 2011. ISSN 0731-7085.

SAFAEI, Z. et al. Determination of fluconazole in human plasma by reverse phase high performance liquid chromatography. **Acta Poloniae Pharmaceutica,** Warsaw, v. 72, n. 2, p. 227-233, 2015. ISSN 0001-6837.

SANTOS, S. R. C. J. et al. Fluconazole plasma concentration measurement by liquid chromatography for drug monitoring of burn patients. **Clinics**, São Paulo, v. 65, n. 2, p. 237-243, 2010. ISSN 1807-5932.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 406, n. 8, p. 2027-2066, 2014. ISSN 1618-2642.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K.; BIDGOLI, A. A. H. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 7, p. 2149-2158, 2011. ISSN 1618-2642.

SASONGKO, L. et al. Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 56, n. 5, p. 551-561, 2003. ISSN 0306-5251.

SCHIAVE, L. A. et al. Fluconazole levels in serum and cerebrospinal fluid according to daily dosage in patients with cryptococcosis and other fungal infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 11-15, 2018. ISSN 1678-4391.

SENA, L. C. S. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and high-performance liquid chromatography to the analysis of cocaine's major adulterants in human urine. **Toxicology**, Limerick, v. 376, p. 102-112, 2017. ISSN 0300-483X.

SENTELLAS, S.; SAURINA, J. Chemometrics in capillary electrophoresis. Part A: Methods for optimization. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 26, n. 9-10, p. 875-885, 2003. ISSN 1615-9314.

SERESHTI, H.; KHOJEH, V.; SAMADI, S. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters. **Talanta**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 885-90, 2011. ISSN 1873-3573.

SHAMSIPUR, M.; FATTAHI, N. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 28, p. 2978-2983, 2011. ISSN 1570-0232.

SHARIATI, S.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 4, p. 393-400, 2009. ISSN 1570-0232.

SPIRE, B. et al. Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma-rays, and ultraviolet-light. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8422, p. 188-189, 1985. ISSN 0140-6736.

SPIETELUN, A. et al. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, Amsterdam, v. 119, p. 34-45, 2014. ISSN 0039-9140.

STALIKAS, C. et al. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 2, p. 175-189, 2009. ISSN 0021-9673.

SONG, J. J. et al. Quantitative determination of fluconazole by ultra-performance liquid

chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Drug Research**, Stuttgart, v. 65, n. 1, p. 52-56, 2015. ISSN 2194-9379.

TAHMASEBI, E.; YAMINI, Y.; SALEH, A. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 20-21, p. 1923-1929, 2009. ISSN 1570-0232.

TALEBIANPOOR, M. S. et al. Application of optimized dispersive liquid-liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 960, p. 1-7, 2014. ISSN 1570-0232.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006. ISSN 0100-4042.

TOUSSAINT, B. et al. An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 1046, p. 26-33, 2017. ISSN 1570-0232.

TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J. et al. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 51, p. 87-106, 2013. ISSN 0165-9936.

UHROVCIK, J. Strategy for determination of LOD and LOQ values - Some basic aspects. **Talanta**, Amsterdam, v. 119, p. 178-180, 2014. ISSN 0039-9140.

VERDIER, M. C. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of four triazole antifungal agents in human plasma. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 48, n. 10, p. 1515-1522, 2010. ISSN 1434-6621.

VONHEEREN, F. et al. Determination of fluconazole in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography with detection at 190 nm. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 745, n. 1-2, p. 165-172, 1996. ISSN 0021-9673.

WALLACE, J. E. et al. Assay of fluconazole by high-performance liquid-chromatography with a mixed-phase column. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 36, n. 3, p. 603-606, 1992. ISSN 0066-4804.

WATERSON, B. **O mundo é magico**: as aventuras de Calvin & Haroldo. São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2007.

_____.**Yokon Yo!** São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2008.

_____. **A hora da vingança**: as aventuras de Calvin & Haroldo. 2ª ed. São Paulo: Conrad

Editora do Brasil, 2009a.

WATERSON, B. **Deu "tilt" no progresso científico.** São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2009b.

_____. **Calvin e Haroldo**: e foi assim que tudo começou. 2ª ed. São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2010a.

_____. **O ataque dos perturbados monstros de neve mutantes e assassinos.** São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2010b.

_____. **Tem alguma coisa babando embaixo da cama.** 2ª ed. São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2010c.

WATTANANAT, T.; AKARAWUT, W. Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. **Biomedical Chromatography**, Chichester, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2006. ISSN 0269-3879.

WILDFEUER, A. et al. Fluconazole: comparison of pharmacokinetics, therapy and in vitro susceptibility. **Mycoses**, Berlin, v. 40, n. 7-8, p. 259-265, 1997. ISSN 0933-7407.

WU, D. et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of fluconazole in human plasma and its application in infants with candida infections. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 31, n. 6, p. 703-709, 2009. ISSN 0163-4356.

XIA, Y. et al. Ultrasound-enhanced surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for determination of ketoconazole and econazole nitrate in human blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 402, n. 3, p. 1241-1247, 2012. ISSN 1618-2642.

YAMINI, Y. et al. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1124, n. 1-2, p. 57-67, 2006. ISSN 0021-9673.

YAN, H. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 54, n. 1, p. 53-57, 2011. ISSN 0731-7085.

YAZDI, A. S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S. R. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 75, n. 5, p. 1293-1299, 2008. ISSN 0039-9140.

YUAN, S. et al. A Simple HPLC Method for the determination of fluconazole in human plasma and application to a pharmacokinetic study. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 33, n. 10, p. 1699-1703, 2014. ISSN 0326-2383.

YUDTHAVORASIT, S.; CHIAOCHAN, C.; LEEPIPATPIBOON, N. Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography

tandem mass spectrometry. **Microchimica Acta**, Wien, v. 172, n. 1-2, p. 39-49, 2011. ISSN 0026-3672.

ZANG, X. et al. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009. ISSN 0253-3820.

ZAREI, A. R.; GHOLAMIAN, F. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for spectrophotometric determination of barbituric acid in pharmaceutical formulation and biological samples. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 412, n. 2, p. 224-228, 2011. ISSN 0003-2697.

ZARGAR, B.; HATAMIE, A. Hollow fiber liquid based microextraction combined with high-performance liquid-chromatography for the analysis of lidocaine in biological and pharmaceutical samples. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 6, n. 8, p. 2506-2511, 2014. ISSN 1759-9660.

ZARGAR, B.; PARHAM, H.; HATAMIE, A. Hollow fiber liquid based microextraction of nalidixic acid in urine samples using Aliquat 336 as a carrier combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 257-263, 2016. ISSN 0021-9665.

ZHANG, C. et al. Ultrasonic-assistant dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for quick determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Digital Manufacturing & Automation III**, Stäfa, v. 190-191, p. 603-608, 2012. ISSN 1660-9336.

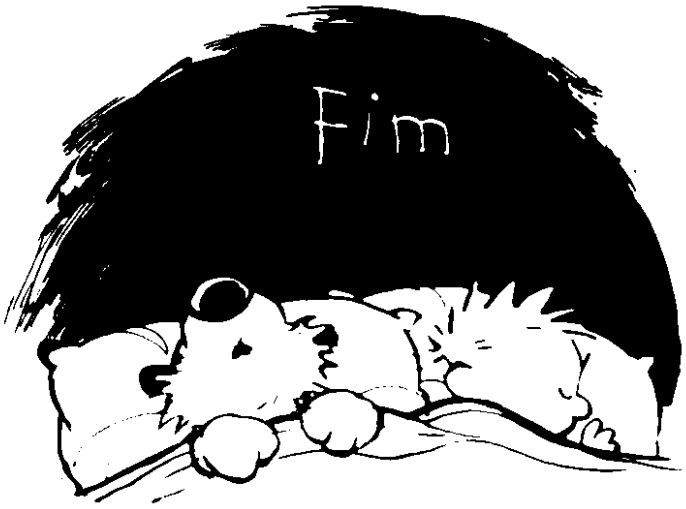
ZHANG, J.; SU, T.; LEE, H. K. Development and application of microporous hollow fiber protected liquid-phase microextraction via gaseous diffusion to the determination of phenols in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1121, n. 1, p. 10-15, 2006. ISSN 0021-9673.

ZHANG, P. et al. A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 83, n. 5, p. 1711-1715, 2011. ISSN 0039-9140.

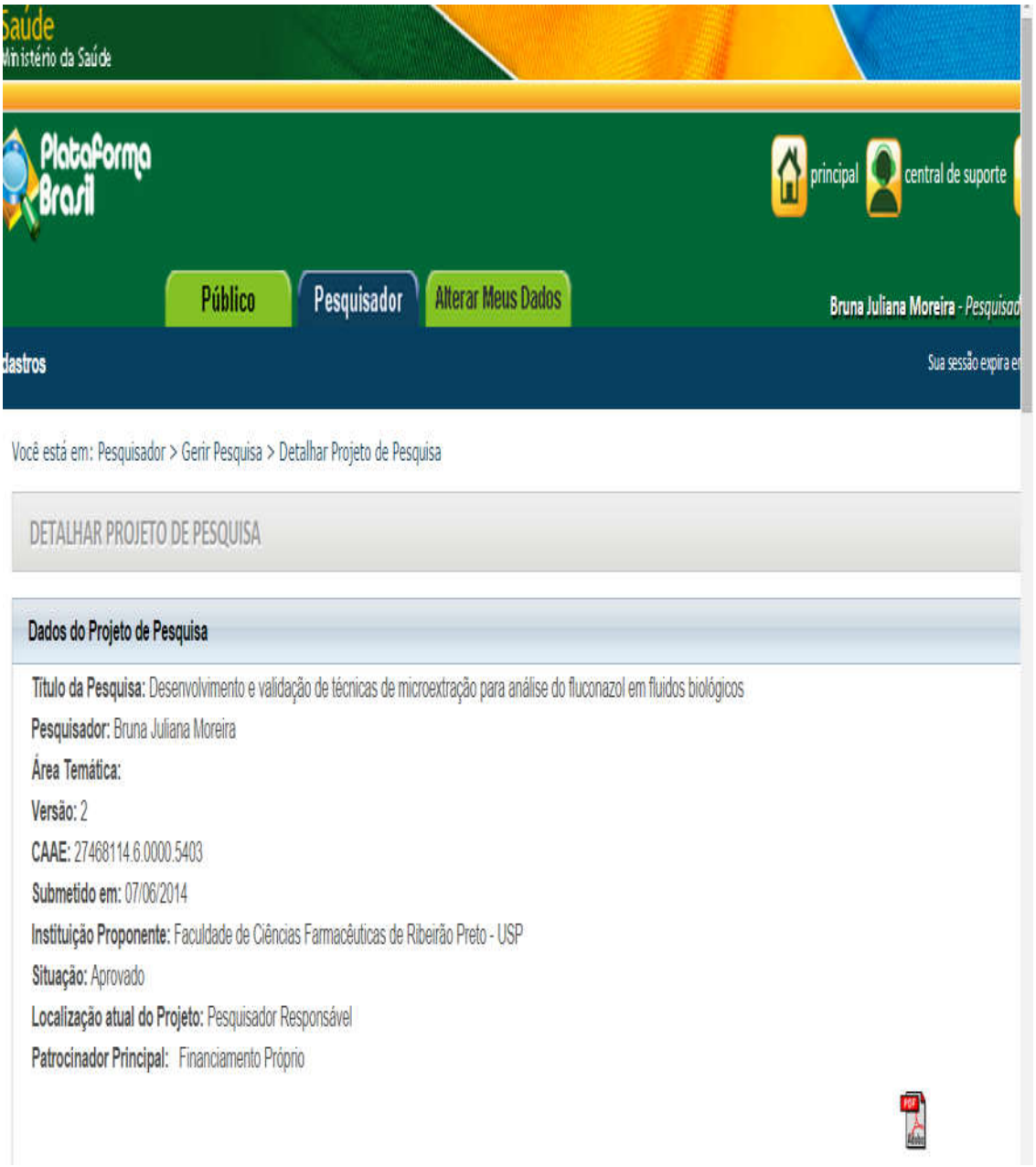
ZHANG, S. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the determination of fluconazole in human whole blood using sofid phase extraction. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 30, n. 3, p. 314-319, 2008. ISSN 0163-4356.

ZHANG, Y. et al. Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of triazole fungicides in fruit juices. **Food Analytical Methods**, New York, v. 9, n. 3, p. 596-604, 2016. ISSN 1936-9751.

ZHOU, J. et al. Orthogonal array design for optimization of hollow-fiber-based liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for study of the pharmacokinetics of magnoflorine in rat plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 403, n. 7, p. 1951-1960, 2012. ISSN 1618-2642.



(WATERSON, 2010c)

ANEXOS

Anexo A - Comprovante de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa