

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, FLUOXETINA E SEUS
METABÓLITOS PRINCIPAIS EM LEITE MATERNO POR INJEÇÃO DIRETA
DE AMOSTRA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA.”**

Bianca Rebelo Lopes Simões

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientadora: Quezia Bezerra Cass

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S593qc Simões, Bianca Rebelo Lopes.
Quantificação de carbamazepina, fluoxetina e seus metabólitos principais em leite materno por injeção direta de amostra utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa / Bianca Rebelo Lopes Simões. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
106 f.

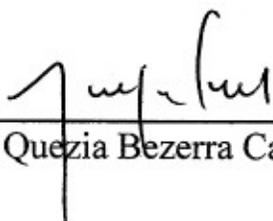
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química orgânica. 2. Leite materno. 3. Cromatografia multidimensional. 4. Colunas RAM. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Injeção direta. I. Título.

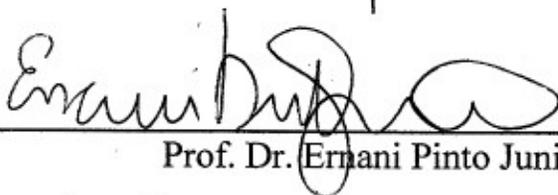
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

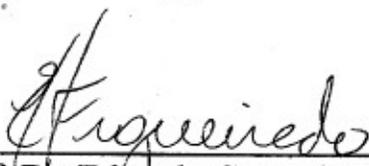
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Bianca Rebelo Lopes Simões**, realizada em 05 de abril de 2013:*



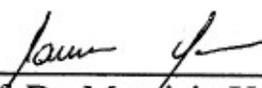
Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



Prof. Dr. Ermani Pinto Junior



Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo



Prof. Dr. Mauricio Yonamine



Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho

*Dedico esta tese à minha linda família,
Gustavo, Laura e ao bebê que está chegando.*

“Porém, o maior de todos os erros é a má interpretação do objetivo final do conhecimento; pois, alguns homens ambicionam o conhecimento em função de uma natural curiosidade e uma índole inquiridora; alguns para entreter a mente com variação e deleite; alguns, para fins de retórica e reputação; alguns para contendas e triunfos; muitos, para triunfo e subsistência; e bem poucos, a fim de empregar o Divino dom da razão para uso e benefício da humanidade.”

Francis Bacon

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Quezia B. Cass pela amizade, pelos inúmeros ensinamentos que rompem os conhecimentos expressos nesta tese e principalmente pela confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Juliana Cristina Barreiro pela colaboração intelectual e principalmente pela amizade.

Aos amigos do grupo: Marina Denadai, Bruna Neto, Thais Castral, Kenia Vanzolini, Roberta Belaz, Franciane Moura, Fernando Almeida, Ricardo Sprenger, Josiane Cardoso, Dra. Neila Cassiano, Dra. Marcela Moraes, Dra. Regina Vincenzi, Dr. Tiago Lourenço e Dr. Paulo Adalberto.

À Dra. Patricia Baraldi e ao Instituto de Vita Nova pelos compostos concedidos.

À maternidade Dona Francisca Cintra Silva pelo leite materno doado.

Às secretárias da Pós-graduação em Química da UFSCar, Cristina, Ariane e Luciane, pela eficiência no desenrolar das atividades da secretaria.

Aos docentes e ao corpo técnico do Departamento de Química que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPq pela bolsa concedida, CAPES e FAPESP pelos auxílios financeiros.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Aplicação da SPME na análise de amostras biológicas.	14
TABELA 1. 2: Uso da TFC para análise de amostras biológicas	15
TABELA 1. 3: Uso de colunas RAM para análises em matriz biológica	19
TABELA 1. 4: Fatores que influenciam na transferência do fármaco para o leite	23
TABELA 2. 1: Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da CBZ e ECBZ.	28
TABELA 2. 2: Porcentagens de proteínas do leite materno excluídas das colunas RAM-BSA.	39
TABELA 2. 3: Condições cromatográficas e eventos.	43
TABELA 2. 5: Valores obtidos para o EM com fase de exclusão água/ISO 95:5.	50
TABELA 2. 7: Precisão, exatidão, média entre lotes (n = 5), inter-lotes (n = 15), e recuperação.	52
TABELA 3. 1: Propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos da FLU e NOR. ¹⁴²	58
TABELA 3. 2: Relação entre d.i. e o consumo de solvente. ²¹	67
TABELA 3.3: Porcentagens de proteínas do leite materno excluídas da coluna RAM-BSA C ₁₈ , correspondentes à fração de 0 – 1 min.	69
TABELA 3. 4: Condições ideais de ionização e fragmentação obtidas para fluoxetina e norfluoxetina.	71
TABELA 3. 5: Posição das válvulas e suas respectivas funções durante a análise.	73
TABELA 3. 6: Condições cromatográficas utilizadas no estudo de retenção dos analitos.	73
TABELA 3. 7: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento com a coluna Acquity BEH C ₈	74
TABELA 3. 8: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil.	76
TABELA 3. 10: Condições cromatográficas otimizadas para o acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil.	79
TABELA 3. 11: Condições cromatográficas utilizadas para o acoplamento com a coluna Ascentis Express fenil hexil.	81
TABELA 3. 12: Coeficiente de variação obtido para o efeito de matriz entre diferentes indivíduos. ...	83
TABELA 3. 14: Precisão, exatidão, média intra lotes (n=5), inter lotes (n=5) e recuperação.	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1: Esquema de formação do eletrospray no modo positivo.	8
FIGURA 1. 2: Esquema de experimentos realizados no QqQ.....	10
FIGURA 1. 3: Esquema de experimentos realizados no IT.....	11
FIGURA 1. 4: Esquema de exclusão das colunas do tipo RAM.....	16
FIGURA 1. 5: Esquema do sistema multidimensional no modo forward-flush.....	17
FIGURA 1. 6: Esquema para avaliação de ME, RE e EP adaptado de Trufelli. ⁸⁸	20
FIGURA 1. 7: Composição nutricional do leite materno, adaptado de Petherick. ¹⁰⁶	25
FIGURA 2. 1: Estrutura da (A) Carbamazepina e (B) 10,11-epóxicarbamazepina	28
FIGURA 2.2: Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue.....	37
FIGURA 2.3: Esquema do procedimento utilizado para avaliar a eficiência na exclusão das proteína do leite materno pelas colunas RAM-BSA.....	38
FIGURA 2.4: Porcentagens de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA correspondentes às frações eluídas de 0 – 2 min	39
FIGURA 2. 5: Espectros obtidos da reação proteína-corante das amostras de referência e das frações coletadas após eluição na coluna RAM-BSA C ₁₈ (A) volume de injeção de 50 µL ; (B) volume de injeção de 100 µL e (C) volume de injeção de 200	40
FIGURA 2. 6: Cromatogramas referentes aos perfis de exclusão das proteínas totais do leite materno, da α -lactalbumina e da β -caseína, na coluna RAM-BSA C ₁₈ . Fase móvel: água 100%, volume de injeção: 100 µL, vazão: 1,0 mL/min e λ = 280 nm.	41
FIGURA 2. 7: Esquema de válvula comutadora utilizado para as análises.	42
FIGURA 2. 8: Cromatogramas obtidos para a injeção de CBZ e ECBZ em água (50 µg/mL) tendo MeOH/água como fase de extração, vazão: 1,0 mL/min, volume de injeção: 100 µL e λ = 210 nm. ..	43
FIGURA 2. 9: Cromatograma obtido na análise de leite materno fortificado com CBZ e ECBZ, avaliados em λ = 210 e 280 nm.	44
FIGURA 2. 10: Cromatogramas obtidos para a exclusão de componentes do leite materno com água 100% e água/isopropanol 95:5, volume de injeção: 100 µL e λ = 210 nm.....	45
FIGURA 2. 11: Cromatograma obtido para a análise de CBZ e ECBZ para definição do tempo de acoplamento nas seguintes condições: 0 - 3 min água/isopropanol 95:5; 3 - 15 min MeOH/água 50:50; 15 - 25 min ACN/água/isopropanol 75:15:10 e 25 - 30 min água/isopropanol. Vazão: 1,0 mL/min, volume de injeção: 100 µL e λ = 210 nm.	45

FIGURA 2. 12: Esquema das condições cromatográficas definidas para o método.....	46
FIGURA 2. 13: Espectros de massa obtidos para CBZ e ECBZ respectivamente.....	47
FIGURA 2. 14: Cromatogramas de íons extraídos obtidos para o leite materno branco e leite materno fortificado com 100 ng/mL de cada analito.	48
FIGURA 2. 15: Esquema de infusão pós-coluna.	49
FIGURA 2. 16: Cromatogramas de íons extraídos obtidos na análise do efeito de matriz pós-coluna	49
FIGURA 2. 17: Cromatogramas de íons extraídos obtidos na análise do efeito de matriz por extração on-line.....	50
FIGURA 2. 18: Curvas analíticas obtidas para CBZ e ECBZ.	51
FIGURA 2. 19: Cromatograma de íons extraídos obtidos para a amostra de uma doadora e os respectivos espectros de massa de CBZ e ECBZ.	54
FIGURA 3. 1: Estrutura da (A) Fluoxetina e (B) Norfluoxetina.	58
FIGURA 3. 2: Cromatogramas referentes ao perfil de exclusão das proteínas totais do leite materno em 280 nm e dos oligossacarídeos em 210 nm. Fase móvel: 0-4 min: água/isopropanol 95:5; 4-7 min: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM; pH 5,8) 70:30; 7-9 min: ACN/água/isopropanol 75:10:15; 9-12 min: água/isopropanol 95:5; vazão 400 µL/min.	68
FIGURA 3. 3: Porcentagens de exclusão correspondentes às frações eluídas de 0 - 1 min.....	69
FIGURA 3. 4: Comparação da exclusão entre a coluna RAM-BSA e as colunas comerciais A) perfil das proteínas a 280 nm e B) perfil dos oligossacarídeos a 210 nm Fase móvel: 0-4 min: água/isopropanol 95:5; 4-7 min: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM; pH 5,8) 70:30; 7-9 min: ACN/água/isopropanol 75:10:15; 9-12 min: água/isopropanol 95:5; vazão 400 µL/min.	70
FIGURA 3. 5: Esquema de válvulas utilizado para as análises no sistema 2D LC-MS. (A) sistema desacoplado – etapa de exclusão e (B) sistema acoplado – etapa de transferência.....	72
FIGURA 3. 6: Cromatogramas obtidos para a eluição de (A) FLU e (B) NOR nas diferentes proporções de fase móvel.	74
FIGURA 3. 7: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C ₁₈ e coluna analítica Acquity BEH C ₈	75
FIGURA 3. 8: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C ₁₈ e coluna analítica Acquity BEH C ₈	75
FIGURA 3. 9: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C ₁₈ e coluna analítica Acquity BEH fenil.	77
FIGURA 3. 10: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos na coluna RAM-BSA.....	78

FIGURA 3. 11: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Acquity BEH fenil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) na coluna RAM-BSA.....	78
FIGURA 3. 12: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Acquity BEH fenil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) durante a análise.	80
FIGURA 3. 13: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Ascentis Express fenil hexil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) durante a análise.....	81
FIGURA 3. 14: Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Ascentis Express fenil hexil após adição de isopropanol e ácido fórmico.	82
FIGURA 3. 15: Cromatograma de íons extraídos obtido para o leite materno branco.	82
FIGURA 3. 16: Curvas analíticas obtidas para (A) FLU e (B) NOR.....	84
FIGURA 3. 17: Cromatogramas dos íons extraídos obtidos para a amostra de uma doadora em tratamento com fluoxetina, A) norfluoxetina e B) fluoxetina.	87

RESUMO

QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, FLUOXETINA E SEUS METABÓLITOS PRINCIPAIS EM LEITE MATERNO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.

O presente trabalho reporta a aplicação de métodos bioanalíticos com injeção direta de amostra para a quantificação de fármacos no leite materno. Colunas contendo fase do tipo RAM-BSA, em escala convencional e *microbore*, foram preparadas e avaliadas na exclusão de proteínas totais e oligossacarídeos de leite materno. Na escala convencional, a coluna RAM-BSA C₁₈ (4,6 mm d.i.) foi utilizada no modo simples de análise para *clean-up* e quantificação simultânea de carbamazepina e do seu metabolito principal, empregando-se um analisador do tipo ion trap. Seletividade, eficiência de extração, a exatidão e precisão foram obtidos, injetando-se 100 µL de amostra sem pré-tratamento. Foram alcançados limites de detecção de 20,0 ng/mL para CBZ e 40,0 ng/mL para ECBZ. O método desenvolvido foi validado e aplicado para a análise de uma amostra de leite materno de uma mãe em tratamento com carbamazepina. Ambos, CBZ e CBZE, foram quantificados nas concentrações de 2,26 µg/mL e 1,54 µg/mL, respectivamente. Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho sobre a determinação simultânea de CBZ e seu metabolito ativo por injeção direta de leite materno. O método para a quantificação de fluoxetina e norfluoxetina por injeção direta de leite materno utilizando um sistema de 2D LC-MS foi desenvolvido com um tempo total de análise de 12 minutos. O sistema cromatográfico foi configurado usando uma coluna RAM-BSA C₁₈ (2,1 mm d.i.), na primeira dimensão, que foi capaz de excluir 94% de proteínas. Uma coluna do tipo *fused core* foi utilizada na segunda dimensão, como coluna analítica. Seletividade, eficiência da extração, exatidão e precisão foram obtidos com a injeção de apenas 10 µL de amostra, sem pré-tratamento. Os limites de quantificação conseguidos foram de 3,0 ng/mL e 4,0 ng/mL para FLU e NOR, respectivamente.

ABSTRACT

QUANTIFICATION OF CARBAMAZEPINE, FLUOXETINE AND ITS MAJORS METABOLITES IN BREAST MILK BY DIRECT INJECTION SAMPLE USING LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY.

This work reports the application of bioanalytical methods by direct injection sample for the quantification of drugs in breast milk. Columns with stationary phase type RAM-BSA, in conventional scale and microbore, were prepared and evaluated in the exclusion of total protein and human milk oligosaccharides. In the conventional scale, the RAM-BSA C₁₈ column (4.6 mm id) was used in a single-column mode for clean-up and simultaneous quantification of carbamazepine and its major metabolite, employing an analyzer of the type ion trap. Selectivity, extraction efficiency, accuracy and precision were achieved employing 100 µL of the sample, without preparation, with detection limits of 20.0 ng/mL for CBZ and 40.0 ng/mL for CBZE. The developed method was validated and applied to analyze breast milk samples from one nursing mother. CBZ and CBZE were quantified in the concentrations of 2.26 µg/mL and 1.54 µg/mL, respectively. To our knowledge, this is the first report on the simultaneous determination of CBZ and its active metabolite by direct injection of human milk serum. The method for quantification of fluoxetine and norfluoxetine by direct injection of nature human milk employing a liquid chromatography tandem mass spectrometry system was performed in a multidimensional system with total analysis time of 12 min. The chromatographic system was configured using a RAM-BSA C18 (2.1 mm, i.d.) column in the first dimension that was able to excluded 94% of proteins. A fused core column was used in the the second dimension as analytical column. Selectivity, extraction efficiency, accuracy and precision were achieved employing 10 µL of the sample, without sample clean-up, with quantification limits of 3.0 ng/mL and 4.0 ng/mL for FLU and NOR, respectively.

SUMÁRIO

FUNDAMENTOS.....	3
1.1. ON-LINE LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS.....	3
SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	3
ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	7
NOVAS TENDÊNCIAS EM PREPARO DE AMOSTRA	12
RESTRICTED-ACCESS MATERIAL – RAM	16
1.2. LEITE MATERNO.....	21
QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMAZEPINA E SEU METABÓLITO ATIVO EM LEITE MATERNO POR INJEÇÃO DIRETA UTILIZANDO LC-MS/MS	27
2.1 Introdução.....	27
2.2 Objetivos	29
2.3 Experimental	29
2.3.1. Generalidades	29
2.3.2. Preparo das colunas RAM-BSA.....	30
2.3.3. Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA.....	31
2.3.4. Desenvolvimento do método.....	32
Sistema LC-MS/MS.....	32
Preparo das soluções de trabalho.....	33
Preparo das amostras	34
Validação do método	34
Aplicação do método	36
2.4 Resultados e Discussão	36
2.4.1. Avaliação das colunas RAM-BSA	36
2.4.2. Desenvolvimento e validação do método.....	41
Seletividade	48
Efeito de matriz	48
Linearidade.....	51
Precisão e Exatidão	52
Aplicação do método	53
2.5 Conclusões	54

QUANTIFICAÇÃO DE FLUOXETINA E NORFLUOXETINA EM LEITE MATERNO UTILIZANDO A 2D LC-MS/MS.	57
3.1 Introdução	57
3.2 Objetivos	59
3.3 Experimental	60
3.3.1 Generalidades	60
3.3.2 Preparo da coluna RAM-BSA em escala microbore.	60
3.3.3 Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno	60
3.3.4 Desenvolvimento do método	62
Sistema 2D LC-MS/MS.....	62
Preparo das soluções de trabalho.....	63
Preparo das amostras	63
Validação do método	64
Aplicação do método	65
3.4 Resultados e Discussão	65
3.4.1 Desenvolvimento do método	66
Perfil de exclusão proteica pela coluna RAM-BSA em escala microbore.....	67
Condições de ionização dos analitos.....	70
Configuração do sistema 2D LC-MS	71
Condições de retenção, extração e transferência dos analitos, e acoplamento 2D.....	73
3.4.2 Validação do método	82
Seletividade	82
Efeito de matriz	83
Linearidade.....	84
Precisão e Exatidão	85
Aplicação do método	86
3.5 Conclusões	87
REFERÊNCIAS	90

Capítulo 1

Fundamentos

“Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade. Se um homem não sabe o que uma coisa é, já é um avanço do conhecimento saber o que ela não é.”

Carl Gustav Jung

Fundamentos

1.1. On-line LC-MS/MS para quantificação de fármacos em fluidos biológicos

Atualmente um dos principais desafios da química analítica têm sido o desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes para a quantificação de fármacos em diferentes tipos de fluidos biológicos, células e tecidos. A maior expectativa deste tipo de análise é a obtenção de informações que permitam avaliar a biodisponibilidade, toxicologia, metabolismo, farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco no sistema biológico.¹⁻³ Esta demanda associada ao cenário da química verde tem levado à busca por estratégias que proporcionem análises rápidas com alta sensibilidade, seletividade e baixo consumo de solventes.^{4,5}

Frente a este cenário, nas últimas décadas houve um avanço tecnológico significativo que proporcionou o desenvolvimento de novas tendências nas separações cromatográficas,^{1,6} o aprimoramento das técnicas de ionização e dos analisadores em espectrometria de massa (MS)^{7,8} e o surgimento de sistemas online no preparo de amostra.^{9,10}

Separação Cromatográfica

Hoje em dia há ferramentas que propiciam uma rápida separação dos analitos mantendo ou melhorando a resolução e a eficiência cromatográfica. Dentre elas pode-se citar o uso de colunas monolíticas, colunas preenchidas com partículas sub-2 μm e com sílica de núcleo fundido (*fused core*), altas temperaturas ($T > 60^\circ\text{C}$) e o modo de separação baseado em interações hidrofílicas (HILIC), bem como a cromatografia líquida multidimensional (2D LC).^{1,11}

As colunas monolíticas consistem em uma única porção de sílica porosa funcionalizada, no formato de um bastão ou haste, que devido à alta permeabilidade permite o uso de altas vazões ($> 10 \text{ mL/min}$) sem aumento da pressão no sistema cromatográfico, resultando em análises rápidas e com alta eficiência comparáveis às obtidas com colunas contendo partículas de 3 μm . As

principais limitações para a aplicação destas colunas envolvem estabilidade química restrita na faixa de pH de 2 a 8, baixa resistência à temperatura, baixa diversidade química de fases estacionárias e alto consumo de solvente, indo contra os princípios da química verde.¹

As partículas sub-2 μm têm sido empregadas com sucesso nas diversas áreas da bioanálise. O uso destas partículas como material de preenchimento de colunas cromatográficas proporciona análises mais rápidas e eficientes, obtendo-se melhor resolução quando comparadas às partículas de 3 – 5 μm .¹²

A motivação para a redução do tamanho das partículas está baseada na equação de van Deemter (equação 1):

$$\text{---} \text{---} \quad (1)$$

Esta equação mostra a relação entre a altura do prato (H , μm), a velocidade linear (μ , mm/s) e o tamanho da partícula (d_p). O parâmetro D_M descreve o coeficiente de difusão do analito e as constantes A , B e C representam, respectivamente, o alargamento da banda cromatográfica devido aos diferentes caminhos, a difusão do soluto na fase móvel e a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária.¹³

De acordo com a equação 1 há uma relação inversamente proporcional entre a eficiência da separação (altura do prato) e o tamanho da partícula. Assim, uma diminuição no tamanho das partículas pode resultar em um aumento significativo na eficiência cromatográfica mantendo-se o mesmo tempo de análise ou diminuir o tempo de análise enquanto a eficiência é mantida.¹

Apesar das vantagens associadas à redução no tamanho das partículas, o seu uso passou a ser limitado, pois, de acordo com a lei de Darcy¹⁴ quanto menor o tamanho da partícula maior é a pressão gerada no sistema cromatográfico. Desta forma, para as colunas preenchidas com partículas sub-2 μm serem empregadas com o máximo desempenho cromatográfico foi necessário o desenvolvimento de um equipamento mais sofisticado capaz de trabalhar com pressões acima de 15000 psi dando origem ao sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC – *ultra high pressure liquid chromatography*).¹³ Além deste aprimoramento, houve a necessidade de se reduzir os volumes internos do sistema,

adequar a cela do detector para não haver dispersão e realizar alta taxa de aquisição, utilizar colunas resistentes a altas pressões (com menor diâmetro interno, baixo volume morto e filtros de entrada/saída com menor porosidade) além de injetores com alta precisão para a injeção de pequenos volumes de amostra.^{13,15}

As colunas contendo fases do tipo *fused core* são constituídas por partículas, distribuídas ordenadamente, que possuem um núcleo de sílica fundida recoberto com uma pequena camada de sílica porosa. Assim, é possível obter análises rápidas com eficiência de separação similar às partículas sub-2 µm sem a necessidade de um sistema de UHPLC, uma vez que a faixa de pressão atingida permite seu uso em sistemas de LC convencional.¹² Suas vantagens foram rapidamente exploradas e seu uso foi difundido na comunidade bioanalítica. Limites de quantificação na faixa de 500 pg/mL foram conseguidos para a análise de imipramina e desipramina em plasma de rato.¹² Estas colunas também foram utilizadas na análise de posaconazol em amostras clínicas mostrando-se estável após 1200 injeções.¹²

Diante destes benefícios, as colunas *fused core* vem sendo utilizadas tanto em sistemas convencionais de LC quanto em UHPLC com excelentes resultados em termos de eficiência, apresentando-se como uma ótima alternativa em bioanálise.¹⁶

O uso de altas temperaturas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) diminui a viscosidade da fase móvel proporcionando resultados similares aos obtidos em um sistema de UHPLC. A grande limitação no emprego de altas temperaturas está na estabilidade do suporte cromatográfico a temperaturas acima de 60°C e na possível degradação dos analitos durante a separação.¹

Recentemente, a cromatografia por interação hidrofílica – HILIC - tem sido aplicada como ferramenta analítica na separação de compostos polares proporcionando uma seletividade complementar quando comparado ao modo reverso. Neste modo de eluição, a fase estacionária utilizada é polar e o uso de fase móvel contendo água leva à formação de uma película que fica adsorvida na superfície. Sendo assim, a separação dos analitos é regida pelo mecanismo de partição entre o modificador orgânico da fase móvel e a película de água.⁶ Assim como em todos os modos de separação, as fases estacionárias para o modo HILIC são de extrema importância e vem sendo aprimoradas ao longo dos anos. Inicialmente, as fases estacionárias utilizadas neste modo eram sílica e aminopropil

sílica; num segundo momento as sílicas com grupos diol, amida e ciano foram empregadas e, mais recentemente, foram introduzidas as fases zwitterionicas, que podem ser usadas no modo catiônico ou aniônico, sendo excelentes para compostos iônicos ou ionizáveis.^{17,18}

Em um número cada vez maior de aplicação da LC, amostras complexas e/ou em matrizes complexas exigem sistemas com altíssima eficiência. Exemplos típicos são as aplicações em proteoma, metaboloma, desenvolvimento de novos fármacos e caracterização/identificação de substâncias e seus metabólitos. Para estas amostras, a simples otimização entre fase móvel e estacionária, em uma dimensão (1D LC) muitas vezes, não é suficiente para se obter a resolução adequada.¹⁹ Dentro deste contexto, o desenvolvimento da LC multidimensional tem merecido destaque na separação de misturas complexas, uma vez que as colunas usadas, nas diferentes dimensões, apresentam mecanismos de retenção diferenciados.²⁰ Sendo assim, diferentes seletividades podem ser alcançadas considerando-se os múltiplos modos de separação que podem ser usados em LC.

A combinação de colunas em 2D confere um aumento considerável na capacidade de pico, a qual é refletida na resolução, reduzindo a sobreposição de componentes presentes na amostra. Teoricamente, a capacidade de pico em uma separação 2D é igual ao produto da capacidade de pico em cada dimensão.¹⁹ Sendo assim, quando os mecanismos de separação provêm diferentes seletividades à presença de compostos que co-eluem na amostra em ambas as dimensões são drasticamente minimizados. A capacidade de separação, ou capacidade de pico, é extremamente importante em todas as separações 2D LC; em uma única dimensão é dada pela fórmula mostrada abaixo que, em última análise, é função do número de pratos da separação.²¹

—

Assim, para separações complexas, o número de pratos é a melhor opção para se avaliar a capacidade de pico e conseqüentemente a resolução, que pode ser obtida em uma única injeção. Considerando a equação de número de pratos:

—

Sabe-se que as duas opções para se aumentar resolução, através de N, resultam em aumento da pressão e esse é o fator limitante, no estado da arte de partículas e equipamentos, assim, a separação em 2D é uma interessante alternativa para resoluções de amostras complexas.²¹

As separações em 2D LC podem ser realizadas no modo *on-line* ou *off-line*. O modo *off-line* é o mais utilizado em virtude da sua simplicidade. Frações das amostras injetadas na primeira dimensão são coletadas (manualmente ou utilizando um coletor de fração), concentradas se necessário e, re-injetadas na segunda coluna.¹⁹ No modo *on-line* a 2D LC pode ser realizada de dois modos principais: *comprehensive* (LCxLC) e *heart-cutting* (LC-LC).

No modo LCxLC, todas as partes de uma amostra são submetidas a duas separações, porcentagens iguais de todos os componentes de uma amostra são passadas nas duas dimensões e a resolução obtida na primeira dimensão é mantida na segunda.²⁰ No modo LC-LC apenas uma fração da amostra é transferida para a segunda coluna onde a separação dos compostos de interesse acontece. Em geral o LC-LC é utilizado em sistemas de injeção direta de amostra onde a primeira coluna promove a limpeza da amostra e a concentração dos analitos que são transferidos para uma segunda coluna onde são separados e analisados.⁹ Este tópico será discutido posteriormente em novas tendências de preparo de amostra.

Espectrometria de massa

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectroscopia de massa (LC-MS – *liquid chromatography-mass spectrometry*) tornou-se essencial na identificação e quantificação de compostos em nível traço. No entanto a hifenação das duas técnicas exigiu especial atenção na solução dos problemas de interface, tais como, vaporização da fase móvel vinda do LC, baixa volatilidade e sensibilidade à altas temperaturas dos analitos separados cromatograficamente, tornando-se difícil a ionização a partir das técnicas convencionais utilizadas em MS.^{3,8,22}

Em LC-MS/MS as interfaces de ionização por pressão atmosférica (API) – ESI (*eletrospray ionisation*) e APCI (*atmospheric-pressure chemical ionisation*) – permitem a análise de todas as faixas de polaridade e massa molecular,

além de possibilitar a seleção do modo de ionização, sendo predominantemente utilizadas para a análise de fármacos e seus metabólitos em várias matrizes biológicas.²³

O mecanismo de ionização por ESI, geralmente aceito, consiste na ionização das moléculas presentes na fase líquida (vinda do sistema LC) através da aplicação de um potencial elétrico. Esta fase líquida passa por um capilar sob alta voltagem e à pressão atmosférica, e em sua saída são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) as quais, são dessolvatadas com o auxílio de um gás de fluxo contínuo (geralmente N₂), na medida em que se deslocam. À medida que o solvente evapora o campo interno das gotas aumenta e, quando este chega a valores críticos ocorre uma explosão coulômbica, ou seja, os íons são emitidos e depois são focalizados para o analisador de massa.²⁴ (FIGURA 1.1)

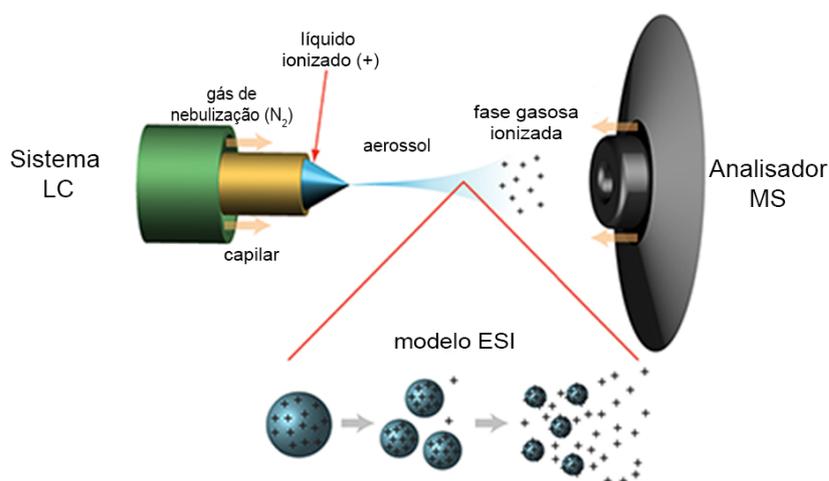


FIGURA 1. 1: Esquema de formação do eletrospray no modo positivo.

Devido à ionização ocorrer diretamente na solução, compostos termicamente sensíveis podem ser ionizados sem que ocorra degradação e, desta forma, o emprego desta interface é preferida quando os analitos são compostos ionizáveis em solução ou altamente polares. Por envolver uma extensa evaporação do solvente, misturas aquosas com modificadores orgânicos voláteis, acetonitrila ou metanol, são preferidos para a ionização por ESI. Desta forma a cromatografia no modo reverso de separação é mais compatível com a espectrometria de massa.²⁵

Diferentemente do mecanismo proposto na ESI, na interface de ionização por APCI o analito é ionizado após estar no estado gasoso. Neste caso, as gotas são formadas e evaporadas por um nebulizador pneumático e o spray formado

passa por uma região aquecida onde o vapor é seco formando espécies neutras, e estas passam por uma corona de descarga onde uma alta voltagem é aplicada. O *spray* é ionizado gerando íons que reagem com as moléculas neutras do analito em fase gasosa produzindo assim os íons correspondentes ao analito. A APCI pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à ESI sendo empregada principalmente na análise de compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis.²⁴

Notavelmente, a MS tornou-se ainda mais atrativa com aos avanços tecnológicos alcançados na instrumentação dos analisadores de massa, como os espectrômetros de massa de alta resolução (HRMS - *high-resolution MS*) e os analisadores híbridos.⁹ A literatura reporta o emprego dos diversos analisadores associados ao sistema 2D LC em estudos com diversos tipos de fluido biológico, tecidos e células, para a análise de drogas e fármacos, poluentes ambientais, produtos naturais e principalmente na análise de biomoléculas, tais como, peptídeos, proteínas, oligossacarídeos, oligonucleotídeos e lipídeos.²⁶⁻²⁹

Para a quantificação de compostos em matrizes complexas utilizando 2D LC-MS é possível reconhecer que os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), o *ion trap* (IT) e o *time-of-flight* (Tof) tem sido os mais empregados.^{9,22,24} O analisador do tipo QqQ é amplamente utilizado em numerosas aplicações. Esta popularidade se deve a capacidade deste instrumento em gerar dados quantitativos de excelente qualidade, uma vez que pode realizar experimentos importantes como, SRM (*selected reaction monitoring*), perda neutra (*neutral loss*), varredura de íons produzidos (*product ion scan*) e varredura do íon precursor (*precursor ion scan*).^{9,30} A FIGURA 1.2 exemplifica os experimentos realizados pelo QqQ.

Para análises quantitativas o modo SRM é preferido, pois proporciona mais seletividade e sensibilidade.³ Neste experimento cada um dos três quadrupolos tem uma função, o primeiro quadrupolo (Q1) é usado para fazer a varredura do íon precursor selecionado; no segundo quadrupolo (Q2), conhecido com cela de colisão, um ou mais íons fragmento específicos são produzidos através da colisão do íon precursor selecionado com um gás inerte (argônio, hélio ou nitrogênio); e no terceiro quadrupolo (Q3) ocorre seleção de um dos íons fragmento gerados em Q2, enquanto este íon fragmento é reconhecido pelo detector outro íon fragmento é gerado em Q2 e posteriormente filtrado por Q3. Resumidamente, em

SRM Q1 e Q3 tem a função de filtrar os íons selecionados enquanto Q2 trabalha como cela de colisão.^{3,30}

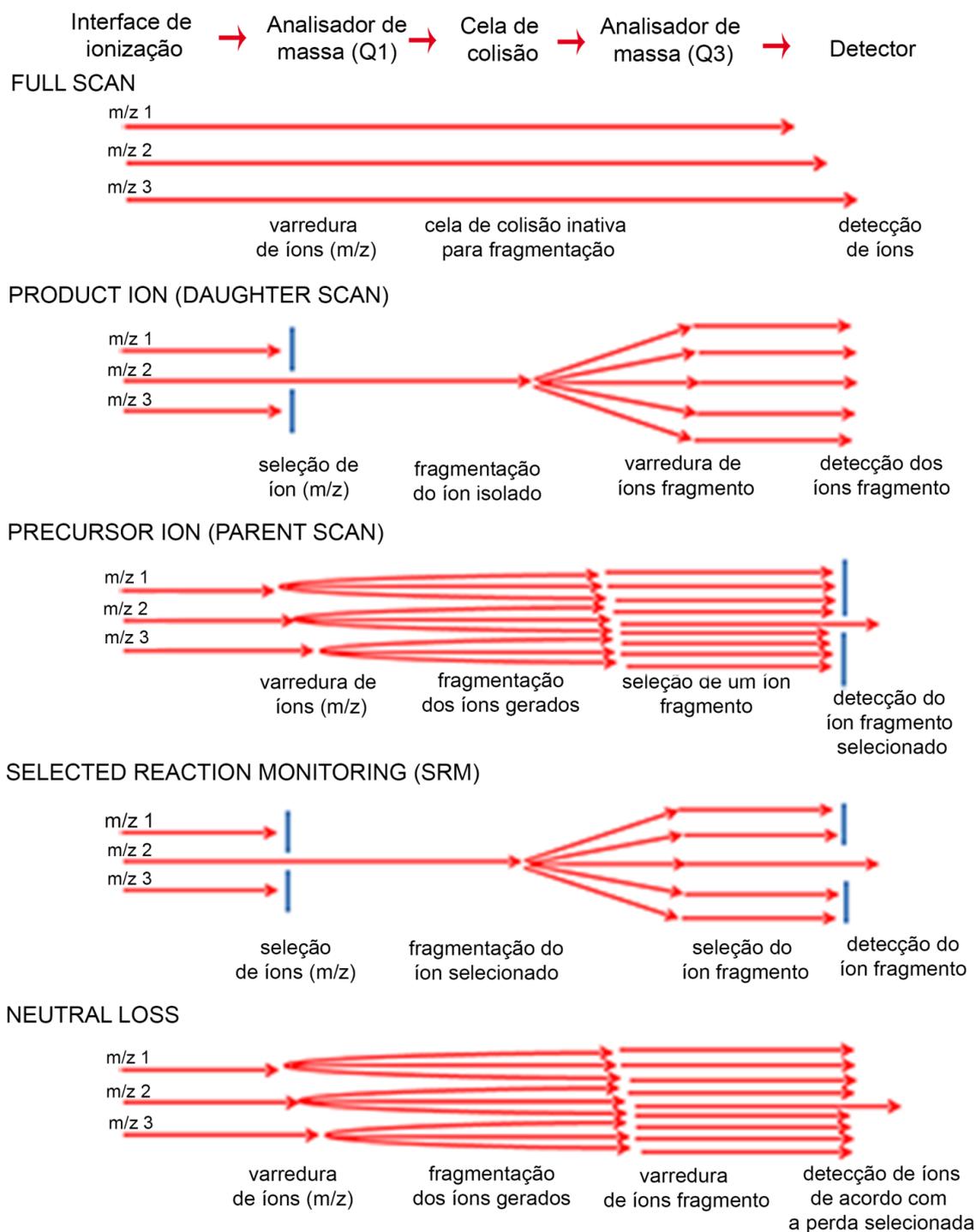


FIGURA 1. 2: Esquema de experimentos realizados no QqQ.

Outro modo de operação do QqQ é o *full-scan* onde os quadrupolos servem de filtro de massa durante todo tempo. Neste modo a sensibilidade é bem

menor porque os ciclos de aquisição para cada m/z monitorada está abaixo de 100%, entretanto sua aplicação para o monitoramento de íons formados na fonte ainda é bastante usual.³⁰

O analisador do tipo IT é um instrumento compacto que tem como vantagem a capacidade de “capturar” e acumular os íons aumentando assim a sensibilidade do sinal. Neste caso, a seleção, a fragmentação e a análise dos íons gerados acontecem na mesma parte do instrumento, sendo estes processos separados apenas pelo tempo.²⁴ O grande diferencial do IT está na capacidade de isolar os íons formados e submetê-los a subseqüentes fragmentações proporcionando um espectro de massa que pode colaborar na elucidação estrutural de um composto.⁹ Entretanto, não podem ser realizados experimentos de íon precursor e de perda neutra, ferramentas poderosas para a identificação de compostos. A FIGURA 1.3 exemplifica os experimentos que podem ser realizados pelo IT.

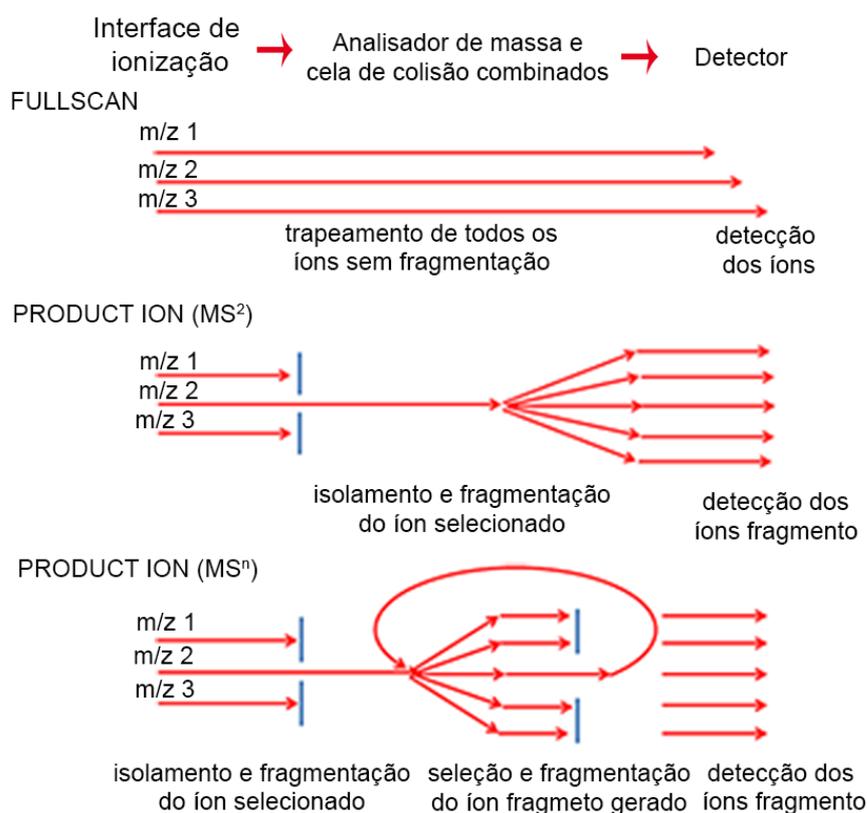


FIGURA 1. 3: Esquema de experimentos realizados no IT.

Os avanços obtidos com a LC-MS devido ao desenvolvimento das fontes API, permitiram o seu emprego tanto para a quantificação quanto para a

elucidação estrutural. Entretanto, apesar da elevada sensibilidade e seletividade inerente à técnica, o uso das fontes ESI e APCI tornam as análises suscetíveis ao chamado efeito de matriz (ME – *matrix effect*), causado pela coeluição de compostos presentes na amostra. Estes compostos podem interferir na ionização dos analitos suprimindo ou aumentando a resposta do sinal, alterando-se a reprodutibilidade, a linearidade e a exatidão do método.

Além disso, a adsorção acumulativa ou a precipitação de proteínas e/ou outras macromoléculas que compõe a matriz biológica pode ocasionar a perda de sensibilidade do MS ou levar ao entupimento do sistema cromatográfico ou das colunas levando à perda de eficiência.^{31,32} Sendo assim, para se obter resultados confiáveis e reprodutíveis em LC-MS, deve ser feito um pré-tratamento eficiente da amostra para que os compostos endógenos sejam removidos e os analitos pré-concentrados.

Novas tendências em preparo de amostra

O preparo de amostra é uma etapa bastante importante para qualquer procedimento analítico, porém quando se trata da análise de matrizes biológicas complexas este passo se torna especialmente crítico. Os métodos empregados nesta fase da análise são geralmente laboriosos e podem contribuir para erros de processo que comprometem a reprodutibilidade, a precisão e a exatidão na quantificação dos analitos. Estas desvantagens associadas ao aumento na utilização do LC-MS para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos motivaram a busca por métodos mais simples e reprodutíveis de preparo de amostra.

A precipitação das proteínas da matriz é um dos procedimentos comumente utilizados para o *clean-up* de amostras biológicas. Normalmente são utilizados solventes orgânicos, com ou sem a adição de um ácido, seguida de centrifugação, ou a simples diluição da amostra. Embora esta estratégia seja simples, ela não proporciona seletividade e, além disso, os agentes de precipitação podem levar à melhora ou à supressão dos sinais dos analitos no MS ou ainda provocar a co-precipitação dos mesmos se estes estiverem fortemente ligados às proteínas da matriz.³²

O ideal é que o preparo da amostra além de simples e rápido, seja reprodutível, econômico e seguro tanto para o analista quanto para o meio ambiente.

Sendo assim, novas tecnologias envolvendo a miniaturização e a automação de métodos estão em constante crescimento, visando atender à demanda por métodos eficientes e com baixa produção de resíduos.^{32,33}

Os avanços tecnológicos nesta área têm levado ao desenvolvimento de sistemas que permitem a injeção direta de amostra reduzindo ou eliminando as etapas de preparo, onde a limpeza da amostra e a pré-concentração dos analitos é feita simultaneamente. Os procedimentos de extração *on-line* representam uma das possíveis configurações da 2D LC-MS empregadas em métodos bioanalíticos. Estes sistemas trabalham com o acoplamento de colunas (*column switching*) através de uma válvula de múltiplas portas e uma, ou mais bombas, que realiza a extração e a transferência dos analitos de maneira seletiva da primeira coluna (extratora) para a segunda coluna (analítica), onde uma separação adicional acontece.¹⁰

A microextração em fase sólida *on-line* (*Solid-phase microextraction - SPME*) foi introduzida na década de 90 e tem se mostrado eficiente e seletiva para a extração de pequenas moléculas de matrizes biológicas. Em geral, a SPME utiliza fibras ou tubos capilares (*in-tube*) revestidos com um polímero que tem função extratora enquanto o analito é adsorvido na superfície externa da fibra ou na superfície interna do capilar.^{9,10}

Os sistemas de SPME *in-tube* podem ser classificados em *flow-through* ou *draw-eject-extraction*. No primeiro sistema, a solução da amostra passa através do capilar continuamente que está acoplado a um sistema de válvulas comutadoras. No segundo sistema o capilar extrator é instalado entre o *loop* e a agulha de injeção e a amostra é repetidamente sorvida e desorvida.³⁴ As desvantagens dos sistemas SPME *in-tube* estão relacionadas a problemas de linha de base, *carryover*, desorção do analito e longos tempos de extração.⁹

O uso da SPME no sistema 2D LC-MS tem sido bastante promissor e algumas de suas aplicações na análise em matrizes biológicas está resumida na TABELA 1.1.

TABELA 1. 1: Aplicação da SPME na análise de amostras biológicas. (adaptado de Caasiano *et al*)⁹

Analito(s)	Matriz	Sistema	Analizador/ detector	Ref.
Anabolizantes esteróides	Urina	draw-eject	ESI-MS	35
Nicotina, cotinina, nornicotina, anabasina, anatabina	Saliva e urina	draw-eject	ESI-MS	36
Moperona, floropipamida, haloperidol, spiroperidol, bromperidol, pimizida	Plasma	draw-eject	ESI-MS/MS	37
Fluoxetina	Soro	draw-eject	ESI-MS	38
Antidepressivos	Plasma e urina	flow-through	ESI-MS	39
Ciprofloxacina, danofloxacina metanosulfonato, enrofloxacina, difloxacina, sarafloxacina, ácido oxolinico, flumequina	Leite bovino, ovos, e tecidos de frango e peixe	draw-eject	ESI-QToF-MS	40
Hormônios	Saliva	draw-eject	ESI-MS/MS	41

Uma alternativa para a injeção direta de amostras biológicas tem sido o uso da cromatografia de fluxo turbulento (*turbulent-flow chromatography* - TFC). Esta técnica possui um mecanismo de extração que envolve colunas cromatográficas com diâmetro interno que variam entre 0,5 e 2,1 mm, tamanho de partículas de sílica na faixa de 25 – 60 μm e vazão da fase móvel acima de 1,2 mL/min. A alta velocidade linear através dos espaços entre as partículas gera um fluxo turbulento que permite a difusão das moléculas, onde as de massa molecular mais baixa são rapidamente conduzidas para dentro dos poros da sílica enquanto as macromoléculas cuja massa molecular é alta são eluidas para um descarte. Em seguida os analitos retidos na coluna são eluidos, separados e analisados.^{10,42}

As colunas de TFC vêm sendo comercializadas com uma variedade de materiais como suporte que permitem seu uso em diferentes aplicações. No entanto, estas colunas possuem baixo tempo de vida útil, em torno de 500 injeções dependendo da matriz, do volume de injeção e do pré-tratamento utilizado, centrifugação, filtração ou precipitação.⁹ A TABELA 1.2 sumariza alguns trabalhos empregando TFC em sistemas 2D LC-MS para análises em matrizes biológicas.

TABELA 1. 2: Uso da TFC para análise de amostras biológicas (adaptado de Cassiano *et al*)⁹

Analito(s)	Matriz	Coluna TFC	MS	Ref
Metanefrina Normetanefrina	Plasma	Cyclone MCX-2 (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	43
Compostos perfluorinados	Cabelo,urina	Cyclone (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ- MS/MS	44
356 compostos	Urina	Cyclone (50x0,5 mm; Thermo)	APCI-QTrap-MS ⁿ	45
Diclofenaco, Rofecoxiba Inibidores da epoxihidrolase	Sangue, Urina, Plasma	Cyclone RP-18 (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QTrap- MS/MS	46
Creatinina	Soro	Cyclone MCX (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	47
Busulfan	Soro, Plasma	Cyclone P (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	48
Sirolimos Everolimus	Sangue	Cyclone (50x0,5 mm; Thermo)	APCI-QTrap- MS/MS	49
Verticina Verticinona Isoverticina	Plasma	Oasis HLB (20x2,1 mm; Waters)	ESI-Q-MS	50
Antibióticos	Leite bovino	Cyclone (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	51
Amitriptilina Desipramina Imipramina Nortriptilina	Soro	Cyclone P (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	52
Enrofloxacina Ciprofloxacina	Tecidos animais	Cyclone(50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	53
Ciclofofamida CEPM	Plasma	Cyclone MAX (50x0,5 mm; Thermo)	ESI-QqQ-MS/MS	54
Telcagepante	Plasma	Cohesive C ₁₈ (50x0,5 mm; Cohesive Technologies)	ESI-QqQ-MS/MS	55
Sitagliptina	Urina	Cyclone(50x0,5 mm; Cohesive Technologies)	ESI-QqQ-MS/MS	56

O desenvolvimento de fases estacionárias recobertas com materiais biocompatíveis ou com polímeros funcionalizados têm se apresentado como alternativa para injeção direta de amostras biológicas em sistemas 2D LC-MS, e dentre elas pode-se citar os polímeros molecularmente impressos (molecularly

imprinted polymers – MIPs), os polímeros monolíticos, materiais imunosorventes, materiais de acesso restrito (*restricted-access materials* - RAMs), entre outros.¹⁰

Restricted-access material – RAM

As colunas do tipo RAM representam uma classe de materiais biocompatíveis amplamente utilizadas na injeção direta de amostras complexas. O mecanismo de exclusão das fases RAM baseia-se nos princípios da cromatografia de superfície discriminante, que combina uma barreira de difusão física e uma barreira de difusão química. Desta maneira estes materiais são capazes de excluir as macromoléculas e reter os analitos baseado em um *cut-off* de massa molecular. Os compostos de baixa massa molecular são extraídos da matriz e retidos pelos mecanismos convencionais de cromatografia, enquanto que as macromoléculas são excluídas no volume morto da coluna devido à repulsão com a superfície externa da partícula, cuja finalidade é impedir a adsorção destas moléculas na superfície.^{32,57} (FIGURA 1.4)

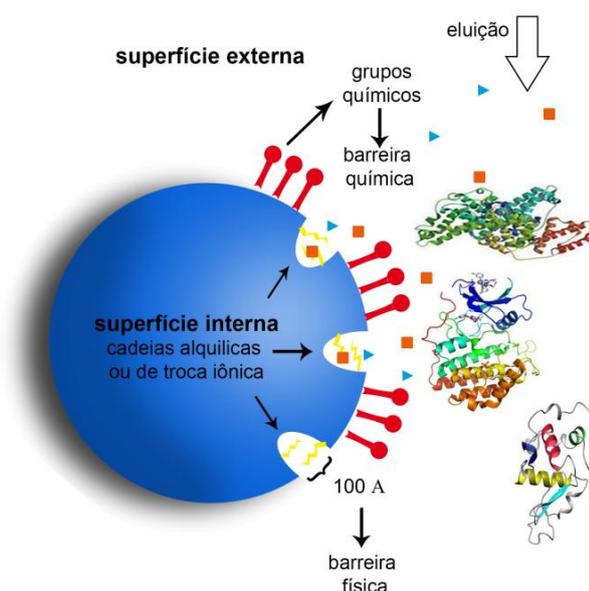


FIGURA 1. 4: Esquema de exclusão das colunas do tipo RAM.

Hagestam e Pinkerton⁵⁸ introduziram em 1985 o conceito das colunas de *internal surface reversed-phase* (ISRP) para a injeção direta de plasma, em seguida surgiram novos suportes com a mesma finalidade, dentre eles: *Shielded hydrophobic phase* (SHP) por Gisch,⁵⁹ *Mixed-functional phase* (MFP) por Haginaka,

⁶⁰ *Alkyl-Diol Silica* (ADS) por Boos, ⁶¹ *Semi-Permeable Surface* (SPS) por Desilets ⁶² e as fases com proteína imobilizada por Yoshida.⁶³ Atualmente estes suportes estão disponíveis comercialmente e são utilizados para análise com diversas matrizes.^{27,31} As fases do tipo RAM podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de exclusão e também em relação ao tipo de grupos ligados à superfície interna e externa. Sendo assim elas são classificadas em unimodal ou bimodal, com barreira física ou química.⁶⁴

O primeiro suporte RAM foi preparado a partir do recobrimento dos sítios externos de uma sílica de fase reversa (C₁₈) com a proteína - α -1-ácido glicoproteico (AGP) humana desnaturada.⁵⁷ Posteriormente, Menezes e Felix³⁹ reportaram a imobilização da albumina sérica bovina (BSA) em suporte C₁₈ *in situ* por cromatografia frontal. Atualmente diversas fases hidrofóbicas (C₈, fenil- hexil, ciano)^{31,65} e fase quiral (β -ciclodextrina),⁶⁶ foram recobertas com albumina sérica bovina (BSA) ou albumina sérica humana (HSA). Estes suportes têm sido amplamente empregados em nosso grupo de pesquisa para a análise de fármacos em plasma,⁶⁷⁻⁶⁹ leite bovino,^{70,71} ovo⁷² e amostras ambientais.^{73,74}

As colunas RAM apresentam grande versatilidade, sendo utilizadas tanto no modo simples quanto no modo multidimensional de análise. No modo simples, a amostra é injetada diretamente na coluna e, após a exclusão das macromoléculas os compostos de interesse são eluídos e analisados. Enquanto que, no modo multidimensional a coluna RAM é usada como pré-coluna e, após a eluição das macromoléculas, os analitos são transferidos para uma coluna analítica, utilizando-se uma válvula de comutação, onde são analisados.³¹ (FIGURA 1.5)

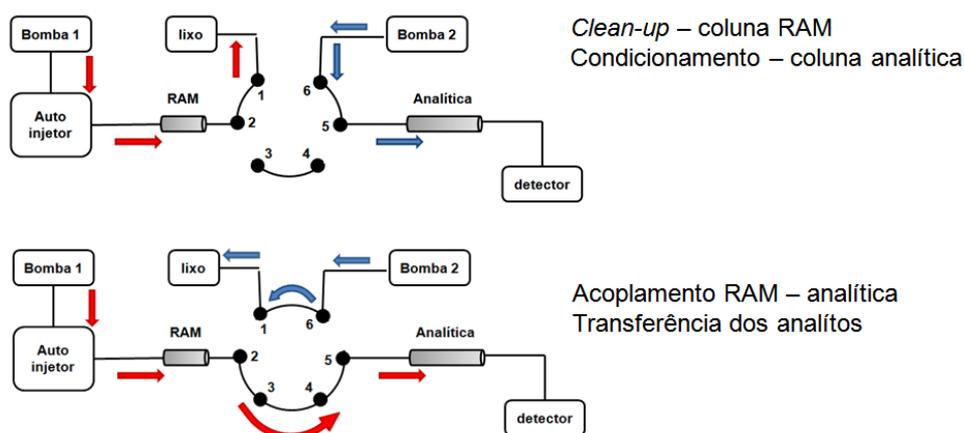


FIGURA 1. 5: Esquema do sistema multidimensional no modo forward-flush.

A TABELA 1.3 mostra diferentes colunas RAMs empregadas na análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas inseridas no sistema 2D LC-MS. Assim como as colunas analíticas, as RAMs que em geral possuem diâmetro interno (d.i.) em torno de 4 mm também tem sido influenciadas pelo conceito de miniaturização. A coluna RAM-ADS-C₁₈ capilar foi preparada e acoplada a um sistema 2D LC-ESI-MS/MS utilizado para a análise de 5 antidepressivos em plasma humano.⁷⁵ A coluna capilar mostrou-se eficiente no *clean-up* das amostras resultando em análises com baixo efeito de matriz e limites de detecção de 1 ng/mL.

Recentemente, foi reportado o preparo e o uso de coluna RAM-BSA-C₈ com d.i. de 2,1 mm para a análise de ampicilina em leite bovino, com limite de detecção de 1,8 ng/mL, inserida em um sistema 2D UHPLC-ESI-MS/MS.⁷⁰

De forma geral, para a injeção direta de fluidos biológicos no sistema 2D LC-MS alguns fatores devem ser cuidadosamente avaliados para que a melhor seletividade seja alcançada nas melhores condições de ionização do analito no MS. Assim, o ideal é que sejam otimizadas a vazão, compatibilidade da fase móvel entre as duas dimensões e, tipo e pH do tampão.⁹ Também devem ser estabelecidas as melhores condições e tempo de lavagem da coluna RAM para que a precisão e a eficiência de extração do método sejam asseguradas.

TABELA 1. 3: Uso de colunas RAM para análises em matriz biológica (adaptada de Cassiano et al)⁹

Analito(s)	Matriz	Coluna RAM	Analizador /detector	Ref.
Triclocarban e metabólitos	Soro e urina	LiChrospher® RP-18 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	Q-Trap-ESI-MS/MS	76
Ac-SDKP pepitideo*	Plasma	TSK® BSA-ODS (35 x 4,6 mm d.i., Tosoh)	QqQ-ESI-MS/MS	77
Nucleosídeos e nucleobases endógenos	Urina	MSPak™ PK-4 ^a (10 x 4,0 mm d.i., 30 µm; Shodex)	QqQ-ESI-MS/MS	78
Bisfenol A, bisfenol A catecol	Urina e microssoma de fígado de rato	LiChrospher® RP-18 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	Q-Trap-ESI-MS/MS	79
Ácidos mercaptúricos	Urina	LiChrospher® RP-8 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	QqQ-ESI-MS/MS	80
Sertralina - enantiômeros e diastereoisômeros	Plasma de rato	Hisep® (50 x 4,0 mm d.i., 5 µm; Supelco)	Q-ESI-MS/MS	81
Pesticidas e seus metabólitos, bisfenol A e F	Urina	LiChrospher® RP-4 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	IT-ESI-MS/MS	78
Rifaximina	Soro de rato	Hisep® (50 x 4,0 mm d.i., 5 µm; Supelco)	Q-ESI-MS/MS	82
Abacavir, nevirapina, indinavir	Soro e urina de rato	Hisep® (50 x 4,0 mm d.i., 5 µm; Supelco)	Q-Trap-ESI-MS/MS	83
Fenóis, parabenos	Soro	LiChrospher® RP-18 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	Q-Trap-APPI-MS/MS	84
Metabólitos da testosterona	Hepatocitos de rato	BioTrap™ 500MS (20 x 4,0 mm d.i., ChromTech)	IT-APCI-MS/MS	85
Estrógenos	Urina	Shim-pack® MAYI-ODS (10 x 4,6 mm d.i., 50 µm; Shimadzu)	Q-ESI-MS	86
Parabenos, triclosan, fenóis	Leite materno	LiChrospher® RP-18 ADS (25 x 4,0 mm d.i., 25 µm; Merck)	Q-Trap-APPI-MS/MS	87
Ampicilina	Leite bovino	RAM-BSA C ₈ (30 x 2,1 mm, 10 µm; <i>home made</i>)	QqQ-ESI-MS/MS	70

Segundo Trufelli, a eficiência do processo de extração (EP) para um sistema LC-MS deve ser analisado considerando-se o efeito de matriz (ME) e a recuperação (RE), que são critérios avaliados durante a validação de um método bioanalítico.⁸⁸ Desta forma ME, RE e EP podem ser estimados através da análise de três grupos de amostra. (FIGURA 1.6) No primeiro grupo (A) são analisadas as amostras de solução padrão, em sete concentrações diferentes (curva de calibração). No segundo grupo (B) a curva de calibração é construída nas mesmas concentrações de A porém com a matriz sendo fortificada com a solução padrão

após o processo de extração. Já no terceiro grupo (C) a matriz é fortificada com a solução padrão antes do processo de extração. (FIGURA 1.6)

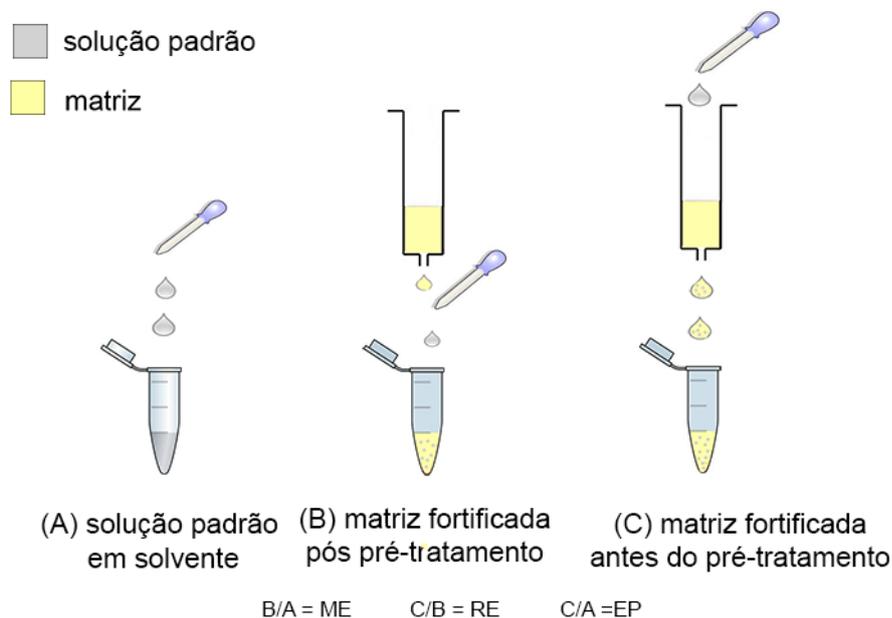


FIGURA 1. 6: Esquema para avaliação de ME, RE e EP adaptado de Trufelli.⁸⁸

Assim, através das áreas dos picos destas análises pode-se calcular a porcentagem do ME, RE e EP através das seguintes fórmulas:⁸⁸

- (1)
- (2)
- ——— (3)

Cabe ressaltar que a avaliação do ME para métodos com extração *on-line* só foi mencionado recentemente pela European Medicines Agency guidelines (EMA)⁸⁹ onde a sugestão para se avaliar o efeito de matriz nestes casos consiste na análise de no mínimo 6 amostras de indivíduos diferentes, fortificadas com o padrão nas concentrações estabelecidas para os controles de qualidade baixo e alto. Segundo a EMA um coeficiente de variação, entre as amostras, de até 15% pode ser aceito como ME. Entretanto, nada foi dito sobre a estimativa da RE, sendo assim considera-se que seja importante, no caso da LC-LC, que as eficiências de extração

e transferência do analito para a segunda dimensão sejam cuidadosamente verificadas.⁹

O efeito de matriz é um parâmetro importante de ser avaliado na validação de métodos bioanalíticos por LC-MS. A presença de substâncias inerentes à matriz biológica e não monitoradas, que coeluem com o analito, podem comprometer a eficiência da ionização do mesmo afetando a detecção e a quantificação. O mecanismo exato deste fenômeno ainda é desconhecido, entretanto assume-se que o efeito é originado através da competição entre os compostos que coeluem no ambiente onde acontece a ionização e a evaporação e esta competição pode suprimir ou aumentar efetivamente a resposta dos analitos.⁸⁸

Os fosfolipídeos são compostos endógenos presentes em todas as matrizes biológicas em altas concentrações e, são considerados os principais responsáveis pelo efeito de matriz.⁹⁰ Diversas técnicas tem sido aplicadas para o *clean-up* dos fosfolipídeos em amostras biológicas entretanto, a eliminação de sua interferência representa um dos maiores desafios dos métodos bioanalíticos por LC-MS. A dificuldade de se eliminar completamente o efeito destes compostos está associada à sua alta concentração na matriz e, principalmente à sua variabilidade em relação às diferentes classes, subclasses, polaridade e massa molecular.⁹¹

1.2. Leite materno

O leite materno é considerado o alimento mais adequado para os recém-nascidos por apresentar a composição ideal de nutrientes essenciais. Através do aleitamento, a criança recebe os componentes necessários para hidratação, desenvolvimento e proteção, sendo o leite materno isento de contaminação e perfeitamente adaptado ao seu metabolismo. Devido a estes fatores, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que a prática do aleitamento materno seja exercida de forma exclusiva durante os primeiros seis meses.⁹²

Diversos estudos têm relatado a importância da amamentação na proteção imunológica, na adequação nutricional e no desenvolvimento cognitivo e psicoafetivo da criança. A redução na incidência da obesidade infantil, doenças cardiovasculares, respiratórias e diabetes nas crianças amamentadas e a redução do risco de câncer de mama e alguns tipos de câncer de ovário nas nutrizes, estão associadas aos benefícios gerados pela amamentação.⁹²

Apesar das diversas vantagens relacionadas ao aleitamento, existem fatores que contribuem para a interrupção precoce da amamentação, dentre os quais o uso de medicamentos pelas lactantes, especialmente quando estas são portadoras de doenças crônicas.⁹³ A ingestão de fármacos pela nutriz pode levar desde ao aumento ou diminuição no volume de leite produzido até a exposição do bebê a substâncias que podem causar efeitos prejudiciais ao seu desenvolvimento.^{93,94} Tal fato tem recebido especial atenção, despertando assim o interesse de órgãos da saúde e de inúmeros pesquisadores no intuito de orientar os médicos a respeito da segurança dos medicamentos para uso durante a amamentação.⁹⁵⁻⁹⁷

Considerando a influência das constantes mudanças no consumo de medicamentos, tanto no que se refere às prescrições médicas quanto à automedicação, é imprescindível determinar a segurança dos fármacos durante o período de amamentação e a relação risco/benefício de terapias medicamentosas para a mãe e para o bebê.

Quando um medicamento é administrado para a lactante ele é absorvido pela corrente sanguínea e distribuído pelos fluidos e tecidos do corpo, incluindo o leite. A transferência do fármaco e/ou de seus metabólitos do plasma para o leite ocorre através de difusão passiva geralmente com as substâncias na forma livre e não ionizada. Diversos fatores podem interferir neste mecanismo de transporte e podem estar relacionados com o teor dos componentes do leite materno; com fatores relacionados ao metabolismo da mãe, dose e tempo de tratamento e via de administração; e principalmente a características físico-químicas do fármaco que podem influenciar em sua farmacocinética, dentre elas, massa molecular, grau de ionização, ligação com as proteínas, lipossolubilidade, tempo de meia-vida entre outros.^{98,99} (TABELA 1.4)

TABELA 1. 4:Fatores que influenciam na transferência do fármaco para o leite (adaptada de Chaves *et al*)⁹⁹

Fatores relacionados ao fármaco que influenciam na sua transferência para o leite	
Peso molecular	O tamanho e a massa molecular podem ser fatores determinantes no processo de difusão do fármaco pelos poros das membranas capilares, atingindo facilmente o leite materno moléculas com pesos moleculares menores que 500 Da.
Lipossolubilidade	Substâncias lipossolúveis atravessam a barreira celular lipoproteica acessando o compartimento lácteo rapidamente.
Ligação a proteínas	Fármacos fortemente ligados às proteínas plasmáticas são incapazes de se difundir pelos tecidos e possivelmente serão encontrados no leite em baixas concentrações.
Grau de ionização	O leite materno é levemente mais ácido (pH=7,1) do que o plasma (pH=7,4), favorecendo uma maior concentração de fármacos com pKa entre 6 e 8, conseqüentemente ácidos fracos ionizam melhor no plasma e sua difusão para o leite é menor.
Meia-vida	Fármacos de longa ação mantêm níveis circulantes por maior tempo no sangue materno e, por conseguinte, no leite materno.
Biodisponibilidade	Fármacos com baixa biodisponibilidade são pouco absorvidos pelo lactente, sendo ideais para uso na lactação.
Concentração plasmática materna	A difusão passiva dos fármacos ocorre por gradiente de concentração, portanto elevados níveis séricos tendem a produzir elevados níveis do fármaco no leite. Saber o pico sérico é útil para ajustar o horário de administração do medicamento.

O nível de exposição da criança a um determinado fármaco através do leite materno é geralmente avaliado através da razão entre as concentrações do fármaco no leite e no plasma da mãe (M/P – *milk/plasma*).⁹⁸ Através deste método é possível obter uma estimativa da taxa de transferência. Entretanto, devido à dificuldade de se conseguir lactantes voluntárias para estudos farmacocinéticos de um composto no plasma e no leite, além dos cuidados experimentais para a coleta de amostras sequenciais de leite e plasma, muitos medicamentos não tem a M/P determinada. Sendo assim, estudos *in vitro* e *in vivo* vem sendo desenvolvidos possibilitando a elaboração de modelos matemáticos capazes de prever a quantidade de medicamento ingerido pela criança através do leite materno.¹⁰⁰

Atualmente, o cálculo da dose real de medicamento recebida pelo bebê através da amamentação tem sido uma ferramenta importante para avaliar a segurança do fármaco administrado. Sendo assim, a concentração real de fármaco no leite e o volume ingerido pela criança devem ser conhecidos. Entretanto, estes dados nem sempre encontram-se disponíveis na literatura. O método mais comum para se estimar a média da dose infantil é através da relação entre concentração do

fármaco no leite e o volume de leite ingerido, onde o este volume é considerado como sendo de 150 mL/Kg/dia.¹⁰¹

Apesar do leite materno ser uma matriz não convencional para avaliar a exposição do bebê a substâncias ingeridas pela mãe, ele tem a vantagem de ser coletado facilmente e de forma não invasiva. No entanto, a extração destas substâncias da matriz representa um desafio analítico devido à sua complexidade.

O leite materno é composto por 87% de água e o restante por macro/micronutrientes que correspondem à lactose, proteínas, lipídeos, oligossacarídeos, vitaminas e minerais (FIGURA 1.7). Esta composição nutricional é bastante variável e sofre influência de fatores genéticos, dieta alimentar, sexo do bebê e período amamentação, além de modificar ao logo do dia e, durante a mesma mamada.¹⁰²

Os oligossacarídeos representam o terceiro componente mais abundante do leite materno e tem sido conceituados por demonstrar funções biológicas importantes para a saúde do bebê.¹⁰³ Esta classe de compostos é encontrada em uma faixa de concentração de 5 a 23 g/L dependendo do período de lactação. Os oligossacarídeos do leite materno sofrem variações em sua composição e concentração dependendo do tempo de amamentação e sexo do bebê. Atualmente foram identificadas cerca de 200 espécies de oligossacarídeos no leite materno sendo que um pouco mais de 90 estruturas foram elucidadas.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Frente a esta variabilidade é possível acreditar que estes compostos representem um desafio analítico no que diz respeito a possíveis efeitos de matriz assim como problemas na extração do analito uma vez que dentre as diferentes estruturas encontram-se oligossacarídeos neutros, ácidos, básicos e de diferentes tamanhos de cadeia.

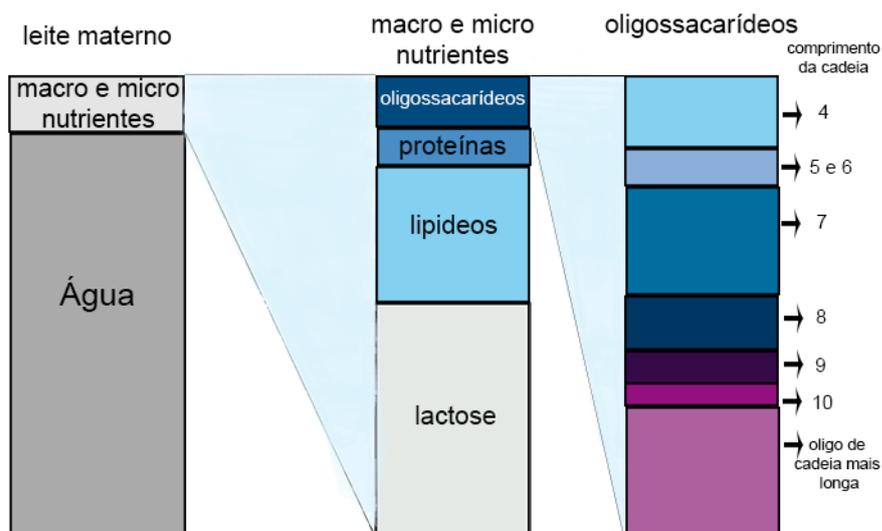


FIGURA 1. 7: Composição nutricional do leite materno, adaptado de Petherick. ¹⁰⁶

Atualmente, a literatura apresenta diversas publicações propondo métodos para quantificação de diferentes classes de fármacos em leite materno. ¹⁰⁷ Marchei *et al* ¹⁰⁸ reportaram a determinação de 18 substâncias lícitas (tabaco e cafeína) e ilícitas (cocaína, canabinoides, anfetaminas) no leite materno utilizando LC-MS/MS, entretanto, até o presente momento, não foi encontrado na literatura nenhum método empregando a 2D LC-MS. Assim, o presente trabalho reporta o uso de colunas RAM-BSA para injeção direta de leite materno no sistema LC-MS na análise dos fármacos carbamazepina e fluoxetina, utilizados no tratamento de nutrizes epiléticas e com depressão pós-parto.

Capítulo 2

**Quantificação de Carbamazepina e seu
Metabólito Ativo em Leite Materno por
Injeção Direta Utilizando LC-MS/MS**

“O pensamento é o ensaio da ação.”

Sigmund Freud

Quantificação de carbamazepina e seu metabólito ativo em leite materno por injeção direta utilizando LC-MS/MS

2.1 Introdução

A amamentação tem se mostrado essencial para a saúde física e psíquica do bebê e da mãe e seus benefícios estão bem estabelecidos na literatura. Nos últimos anos diversas iniciativas foram tomadas para promover a importância e os benefícios da amamentação levando ao aumento desta prática.^{109,110}

No mundo todo, mais da metade das lactantes consomem algum tipo de medicamento e isto é um dos principais fatores que levam à interrupção precoce da amamentação, pois informações sobre a excreção de fármacos no leite materno e seus efeitos para o recém-nascido não estão bem estabelecidas e limitadas a alguns fármacos comumente utilizados pela mãe durante a gestação.¹¹⁰

As desordens mentais representam um problema de saúde pública que afeta um número significativo de gestantes e lactantes, onde cerca de uma em cada 200 gestantes (0,5%) possuem epilepsia.¹¹¹ Dentre os principais anticonvulsivantes utilizados no tratamento de epilepsia a carbamazepina (CBZ) (FIGURA 2.1) é um dos medicamentos considerados seguros para uso durante a lactação apesar de disfunções hepáticas terem sido relatadas como efeitos para a criança amamentada.¹¹² O maior problema na ingestão de fármacos pelo bebê através do leite materno está em sua imatura capacidade de metabolização e excreção, podendo levar a um acúmulo do medicamento em seu organismo.¹¹³

A CBZ é um composto tricíclico, lipofílico e é metabolizado no fígado pelas CYP3A4 e CYP2C8 a 33 metabólitos dentre os quais a 10,11-epoxicarbamazepina (ECBZ) (FIGURA 2.1) é o metabólito mais importante, pois apresenta propriedades farmacológicas similares à CBZ, podendo causar efeitos neurotóxicos.^{114,115} Além disso, há suspeitas de que a ECBZ seja responsável pela maioria dos efeitos colaterais, especialmente as reações cutâneas graves.¹¹⁶

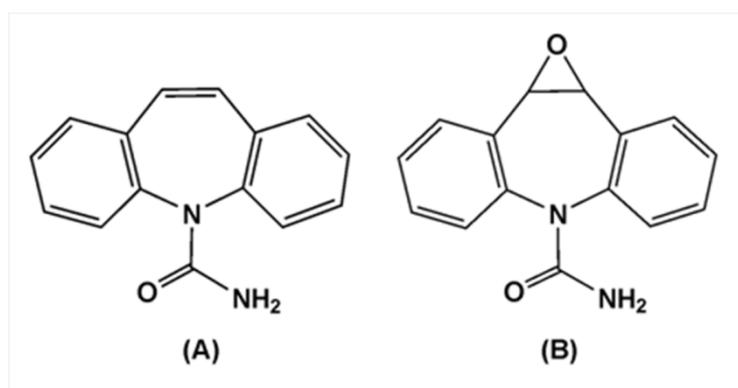


FIGURA 2. 1: Estrutura da (A) Carbamazepina e (B) 10,11-epóxicarbamazepina

TABELA 2. 1: Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da CBZ e ECBZ. ¹¹⁷

Propriedades	carbamazepina	10,11-epóxicarbamazepina
Peso molecular	236,27 g/mol	252,27 g/mol
Lipossolubilidade (log p)	2,5	0,95
Ligação com as proteínas	70 – 80%	-
Grau de ionização (pKa)	13,94	-
Tempo de meia-vida	5 – 16 h	6 h
Biodisponibilidade	70%	-
Concentração plasmática máx.	2 – 18 µg/mL	-
T máx.	4 - 8 h	-

Em estudo realizado com sete lactantes em tratamento com CBZ, foram encontrados no leite materno CBZ e ECBZ em uma faixa de concentração de 2,8 – 4,5 mg/L e 0,8 – 1,7 mg/L, respectivamente. Neste trabalho, foi observado que em média uma criança pesando 4,0 Kg, alimentada com 500 mL de leite por dia, deve ingerir de 1,5 – 3,5 mg de CBZ e 0,25 – 0,82 de ECBZ através da amamentação. ¹¹⁸

Nas últimas décadas uma série de artigos foram publicados para a quantificação simultânea de CBZ e ECBZ em fluidos biológicos por LC-MS. ¹¹⁹⁻¹²² Lionetto *et al*, ¹²³ desenvolveram um método para quantificação de carbamazepina, oxycarbamazepina e seus metabólitos principais em soro. O método descrito utiliza precipitação de proteínas com solvente orgânico e atingiu limites de quantificação de 2,4 e 15,6 ng/mL para CBZ e ECBZ, respectivamente. Entretanto, nenhum trabalho foi encontrado para a análise destas substâncias em leite materno utilizando LC-MS.

Assim, o presente trabalho reporta a quantificação de carbamazepina e seu metabólito principal em leite materno utilizando uma coluna RAM-BSA C₁₈ para injeção direta da amostra em um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa do tipo *ion trap* com ionização por *electrospray* no modo positivo.

2.2 Objetivos

O objetivo central deste trabalho foi o desenvolvimento de um método cromatográfico para a quantificação simultânea de carbamazepina e seu metabólito principal por injeção direta de leite materno no sistema LC-MS.

Os objetivos complementares envolvem:

- Avaliação das colunas RAM-BSA para a exclusão das proteínas do leite materno;
- Avaliação do desempenho das colunas RAM-BSA no modo simples de análise;
- Avaliação das colunas RAM-BSA na eliminação ou redução do efeito de matriz.

2.3 Experimental

2.3.1. Generalidades

Todos os solventes orgânicos, grau HPLC, foram adquiridos da Mallinckrodt Baker (St Louis, EUA). A água utilizada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Albumina sérica bovina ≥98% foi adquirida de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O padrão de CBZ foi doado pelo Instituto de Vita Nova (Hortolândia, Brasil) e ECBZ foi sintetizado e fornecido pela mesma instituição. [¹³C₁, ¹⁵N₁]-carbamazepina foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções

estoque, padrão e deuterada, foram preparadas em acetonitrila e armazenadas a 4°C. Todos os outros reagentes foram de grau analítico. Um *pool* de leite humano foi fornecido pelo banco de leite materno da maternidade Dona Francisca Cintra Silva, do São Carlos, SP, Brasil. As amostras de leite foram armazenadas em alíquotas de 2,0 mL a - 20°C. O uso destas amostras foi aprovado pelo Comitê de ética humano da Universidade Federal de São Carlos.

2.3.2.Preparo das colunas RAM-BSA

As colunas foram preparadas em tubos de aço inoxidável (50,0 x 4,6 mm) preenchidos com as fases hidrofóbicas octil (Luna®, 10 µm e 100 Å) ou octadecil (Luna®, 10 µm e 100 Å), partindo-se de uma suspensão contendo 1,00 g da sílica em 50,0 mL de metanol. A suspensão foi homogeneizada em aparelho de ultrassom por 3 minutos e, em seguida, a coluna foi preenchida em uma empacotadora Shandon sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas em metanol por 12 horas a uma vazão de 1,0 mL/min

Após preenchimento e condicionamento das colunas foi realizada a imobilização da BSA *in situ*, por Cromatografia Frontal de acordo com o procedimento descrito por Menezes e Felix.¹²⁴

Inicialmente uma solução de KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 6,0) foi eluída pela coluna a uma vazão de 1,0 mL/min durante 20 min. Posteriormente, foi eluída uma solução de BSA 2,00 mg/mL (preparada em KH_2PO_4 0,05 mol/L, pH 6,0) por 30 min seguida de lavagem da coluna com água deionizada por 20 min. Imediatamente, duas porções de 10 mL de glutaraldeído a 25%(v/v) foram eluídas promovendo o intercruzamento da BSA.

Após repouso de 12 h a 4°C uma solução de NaBH_4 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até o eluente apresentar pH 10. Após 2h de repouso, a fase estacionária foi lavada com água deionizada por 1h. As colunas preparadas foram mantidas em água e armazenadas a 4°C.

O sistema cromatográfico utilizado para a imobilização da BSA nas fases hidrofóbicas é composto por uma bomba Waters 510 (Milford, USA), um injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, USA) e um detector de ultravioleta Waters 481, acoplados a uma interface Shimadzu CBM 10A (Kyoto, Japan).

2.3.3. Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA

A análise da exclusão proteica foi baseada no método proposto por Bradford.¹²⁵ Para isto foi preparada a solução do reagente de Bradford (100 mg/L), dissolvendo-se 25 mg do corante azul brilhante de Coomassie em 12,5 mL de etanol, acrescentando em seguida 25 mL de ácido fosfórico 85%. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água deionizada e estocada em frasco âmbar para utilização no mesmo dia.

As amostras para análise foram preparadas a partir de um *pool* de leite materno centrifugado por 10 min a 11.000 rpm e 4°C, em centrífuga Eppendorf 5415R.

Após condicionamento da coluna RAM-BSA o leite materno foi injetado no sistema cromatográfico tendo H₂O como fase móvel a 1,0 mL/min. Duas frações de 2,0 mL foram coletadas em balões volumétricos, sendo a primeira fração correspondente ao tempo de eluição de 0 - 2 min e a segunda fração de 2 - 4 min. Após 4 min foi eluída pela coluna uma fase móvel ACN/H₂O/ISO 75:15:10 (v/v/v) durante 10 min para limpeza de possíveis compostos endógenos e lipídios presentes na matriz. Em seguida a coluna foi condicionada por 6 min para nova injeção.

O procedimento de coleta das frações foi realizado em triplicata para os volumes de injeção de 50, 100 e 200 µL de leite materno. As soluções de referência foram preparadas adicionando-se 50, 100 e 200 µL de leite materno (*pool* centrifugado) em balões volumétricos de 2,0 mL e completando-se o volume com H₂O deionizada. A quantidade de proteínas totais presente no eluente foi estimada a partir da razão entre a absorvância das soluções de referência (100%) e a absorvância das amostras coletadas.

Para avaliar o *cut-off* de massa molecular das colunas RAM-BSA para as proteínas do leite humano, foram analisados separadamente os perfis de eluição da β -caseína (24.000 Da) e da α -lactoalbumina (Da 14.178), nas concentrações de 5 g/L, nas mesmas condições utilizadas para avaliar o perfil das amostras de leite humano.

O procedimento de coleta e as análises do perfil de eluição das proteínas do leite materno foram realizadas num sistema cromatográfico contendo duas bombas Shimadzu LC 10ADvp, uma válvula seletora de solvente Shimadzu

FCV-10AL, um auto-injetor Shimadzu SIL 10ADvp, uma válvula de seis caminhos Valco Nitronic 7000 EA (St Louis, USA) e um detector de ultravioleta Shimadzu SPD-10Av operando em 280 nm, acoplados a uma interface Shimadzu SCL 10 Avp.

Para as medidas de absorção foram pipetados 500 µL da amostra de leite e adicionadas em tubos de ensaio contendo 3,0 mL da solução do reagente de Bradford. Após 3 minutos de agitação no vórtex uma alíquota foi transferida para uma cubeta de quartzo e o espectro foi registrado na região de 190 a 800 nm. A absorbância foi medida em 596 nm, comprimento de onda referente à máxima absorbância do complexo; proteína-corante. Todas as frações coletadas e as amostras de referência foram submetidas a este procedimento.

A porcentagem de proteínas totais excluídas pela coluna RAM-BSA foi calculada pela razão entre os valores de absorbância das soluções de referência (100%) e das frações coletadas.

As medidas de absorção molecular na região do UV-visível foram realizadas em um espectrofotômetro HP 8452A (Avondale, USA) utilizando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

2.3.4. Desenvolvimento do método

Sistema LC-MS/MS

O sistema LC-MS/MS utilizado neste trabalho consistiu em um sistema cromatográfico interfaceado com módulo de comunicação Shimadzu modelo CBM-20A, equipado com auto-injetor Shimadzu modelo SIL-20A, degaseificador Shimadzu modelo DGU-20A5 e utilizando duas bombas Shimadzu modelo LC-20AD com uma válvula de seis caminhos Valco Nitronic 7000 acoplado a um detector de UV-vis Shimadzu modelo SPD-20A operando a 210 e 280 nm com aquisição dos dados realizada pelo software Shimadzu Class-Vp. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa modelo Esquire 6000 *ion trap* (IT) (Bruker Daltonics, Germany) com ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo.

A coluna RAM-BSA C₁₈ (50 x 4,6 mm, 10 µm) foi usada no modo simples de análise fazendo simultaneamente a exclusão das macromoléculas da matriz e a análise de CBZ e ECBZ. O método analítico consistiu em exclusão de 0 –

3 min com água/isopropanol 95:5 (v/v); eluição e análise de CBZ e ECBZ de 3 – 13,5 min com metanol/água 50:50 (v/v); limpeza da coluna de 13,5 – 23 min com acetonitrila/água/isopropanol 75:15:10 (v/v/v) e condicionamento de 23 – 28 min com água/isopropanol 95:5 (v/v). A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min, no entanto para que o volume de solução na fonte de ionização fosse de 100 µL/min foi instalado entre a coluna e o MS um divisor de vazão. O volume de injeção utilizado foi de 100 µL.

Os parâmetros das condições de ionização para cada um dos analitos foram otimizados no modo *expert tune* do software Daltonics Esquire. Soluções individuais numa concentração de 100 ng/mL foram diretamente injetadas na fonte de ionização com o auxílio de uma bomba seringa (10 µL/min), nas condições cromatográficas estabelecidas.

O espectrômetro de massas operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM), onde o íon molecular protonado foi isolado, fragmentado e os íons fragmentos monitorados. Para ambos analitos, duas transições de SRM foram respectivamente usadas para quantificação e confirmação: 237 > 194 e 237 > 192 para CBZ; 253 > 210 e 253 > 180 para ECBZ e, 239 > 194 para o padrão interno. Os parâmetros estabelecidos para a análise foram os seguintes: pressão de nebulização = 25,0 psi; vazão do gás de secagem = 6,00 L/min; temperatura = 325 °C; voltagem do capilar = 3,50 kV; amplitude de fragmentação = 0,28 V.

Preparo das soluções de trabalho

Uma solução estoque contendo CBZ (25,0 µg/mL) e ECBZ (50,0 µg/mL) foi preparada em MeOH. As soluções padrão de calibração e padrão de controle de qualidade (CQ) foram preparadas a partir da solução estoque.

As soluções padrão de calibração foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,250; 0,750; 1,50; 2,25; 4,50 e 6,00 µg/mL para o CBZ e 0,500; 1,00; 3,00; 4,00; 9,00 e 12,0 µg/mL para ECBZ. Enquanto as soluções padrão de controle de CQ foram preparadas nas concentrações: 0,300; 2,50 e 5,00 µg/mL para CBZ e 0,600; 5,00 e 10,0 µg/mL para ECBZ.

Para definição das concentrações das soluções de CQ foram utilizados os critérios estabelecidos para validação de métodos bioanalíticos,¹²⁶ onde CQ baixo deve estar entre 110 – 120% da concentração mais baixa da curva de

calibração, CQ médio varia entre 40 – 60% da concentração mais alta da curva de calibração e CQ alto encontra-se entre 75 – 95% da concentração mais alta da curva de calibração.

Para o padrão interno deuterado (IS – *internal standard*) foi preparada um solução padrão de 1,00 µg/mL em MeOH. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C.

Preparo das amostras

Para o preparo das amostras fortificadas foram alíquotados 50 µL da solução padrão e 50 µL da solução do padrão deuterado (1,00 µg/mL). Estas alíquotas foram adicionadas em tubos de cultura de 1,5 mL e evaporadas sob fluxo de N₂. Em seguida as amostras foram reconstituídas em 500 µL de leite materno e homogeneizadas no vórtex por 30 segundos. Para que os analitos atingissem o estado de equilíbrio com os componentes da matriz, as amostras foram mantidas em repouso por 10 min à temperatura ambiente e, posteriormente foram centrifugadas por 15 min a 11.000 rpm e 4°C, resultando em uma camada fina de gordura, uma camada aquosa intermediária e um pequeno precipitado no fundo do tubo. Após este procedimento, 250 µL da fração aquosa foram transferidos para os vials e, destes, 100 µL foram injetados no sistema LC-IT-MS/MS. As amostras de calibração foram preparadas em triplicata enquanto as amostras CQ foram preparadas em quintuplicata.

Validação do método

O método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios internacionalmente aceitos,^{126,127} considerando a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), efeito de matriz e estabilidade.

A seletividade do método foi assegurada pela análise individual de três lotes diferentes de *pool* de leite materno isentos de CBZ e ECBZ (branco). Amostras de leite branco foram inseridas ao final de cada curva de calibração e entre os lotes de amostras de CQ.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se amostras de leite fortificado preparadas em triplicata. Foi considerado como sendo o LD a concentração mínima de analito detectável com a relação sinal-ruído (S/N) igual a três. Já para o LQ foi considerada a menor concentração do analito que pôde ser quantificada com precisão (%CV) de 15 - 20%, entre as replicatas. O LQ foi considerado a concentração mais baixa da curva de calibração.^{126,127}

A linearidade foi determinada a partir do coeficiente de determinação (R^2) que deve ser igual ou superior a 0,98. O valor de r foi calculado a partir da construção de uma curva de calibração, preparada na matriz em seis níveis de concentração, $n = 3$, sendo estes 25,0; 75,0; 150; 225; 450 e 600 ng/mL para a CBZ e 50,0; 100; 300; 450; 900 e 1200 ng/mL para ECBZ. Esta curva foi submetida a um tratamento matemático de regressão polinomial considerando-se a relação entre a área da banda cromatográfica e a concentração do analito.

Precisão e exatidão intra e inter lotes foram avaliados em 3 lotes de CQ, $n = 5$, onde CQ baixo = 30,0 ng/mL, CQ médio = 250 ng/mL e CQ alto = 500 ng/mL para CBZ e CQ baixo = 60,0 ng/mL, CQ médio = 500 ng/mL e CQ alto = 1000 ng/mL para ECBZ. A precisão do método foi expressa em porcentagem como sendo o coeficiente de variação (%CV) entre as replicatas. Enquanto a exatidão do método, também expressa em porcentagem, foi calculada através da razão entre a média das concentrações encontradas para as replicatas e o valor das concentrações nominais.

A eficiência do processo de extração (recuperação) foi calculada através da comparação entre as áreas da banda cromatográfica das amostras de CQ preparadas em água (100%) e em leite materno.¹²⁷

O efeito de matriz foi avaliado de duas maneiras: por infusão pós-coluna (análise qualitativa) e extração *on-line* utilizando-se o sistema *column switching* (análise quantitativa).¹²⁶ Na infusão pós-coluna 100 μ L de amostra de leite branco e de água foram individualmente injetadas na coluna RAM-BSA nas condições cromatográficas estabelecidas. Uma solução aquosa contendo 100 ng/mL de cada analito foi infundida após a coluna e antes da fonte de ionização do MS, com o auxílio de uma bomba de seringa com vazão de 10,0 μ L/min Para o procedimento de extração *on-line*, foram preparadas amostras em água e em leite materno branco contendo 100 ng/mL de cada um dos compostos. A razão entre as

áreas das bandas cromatográficas (área do analito no leite/área do analito na água) foram usadas para avaliar o aumento ou a supressão da ionização.

A confirmação e identificação da CBZ e ECBZ nas amostras analisadas foram asseguradas através da razão entre as duas transições SRM monitoradas e do tempo de retenção dos analitos.¹²⁸

A estabilidade dos analitos na matriz foi avaliada fortificando-se amostras de leite branco, nas concentrações dos CQs. Estas amostras foram analisadas imediatamente após o preparo e em seguida armazenadas a - 20°C. Após 24 horas as amostras foram descongeladas e analisadas e assim sucessivamente por mais um ciclo de degelo de 24 horas.

Aplicação do método

Para a aplicação do método foram coletados 10 mL de leite materno de uma doadora em tratamento com CBZ. A coleta foi realizada 8 h após a administração oral de uma dose do medicamento (200 mg).

Para a quantificação de CBZ e ECBZ nesta amostra utilizando a curva de calibração construída foi necessário realizar a diluição da amostra. Sendo assim, uma alíquota de 100 µL desta amostra foi diluída em leite materno branco obtendo-se um volume total de 1,00 mL. O processo de diluição foi realizado em triplicata e estas amostras foram fortificadas com padrão interno deuterado (100 ng/mL) e submetidas à centrifugação nas condições estabelecidas no preparo de amostra.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1. Avaliação das colunas RAM-BSA

O leite materno pode ser utilizado para estimar a exposição do bebê a fármacos e outras substâncias ingeridas pela mãe. Sua coleta é feita facilmente e de forma não invasiva. Entretanto o maior desafio neste tipo de análise está em extrair o fármaco do leite materno de forma reprodutível. Isto se deve à associação entre

variabilidade na composição da matriz e as propriedades físico-químicas que favorecem ou não a transferência do fármaco do plasma para o leite.^{100,107}

Atualmente uma variedade de colunas RAMs tem sido disponibilizada comercialmente e sua utilização para injeção direta de amostras biológicas está bem estabelecida.⁹ As colunas RAMs imobilizadas com albumina sérica bovina (BSA) em fases hidrofóbicas tem despertado interesse pela simplicidade no modo de preparo^{31,124} e, pela eficiência no *clean-up* de diferentes amostras biológicas^{27,72,75,81} e ambientais.^{73,74}

Sendo assim, para o presente trabalho foram preparadas duas colunas RAM-BSA em suportes C₈ e C₁₈. A imobilização da BSA foi realizada *in situ* por cromatografia frontal de acordo com Menezes e Felix.¹²⁴ O intercruzamento da BSA, a partir da reação dos resíduos de lisina, presentes na proteína, com o glutaraldeído eluído, forma uma rede proteica conferindo assim à fase estacionária maior estabilidade e durabilidade.³¹

A capacidade de exclusão das proteínas totais do leite materno pelas colunas RAM-BSA foi avaliada utilizando o método de Bradford.¹²⁵ Este método determina a quantidade de proteínas totais através da interação destas com o corante *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). (FIGURA 2.2) Sendo assim, quando na presença do corante, as proteínas de alto peso molecular se complexam a ele através de interações hidrofóbicas e interações de London, promovendo um deslocamento na absorção de 495 nm CBB livre para 596 nm correspondente ao complexo CBB-proteína.

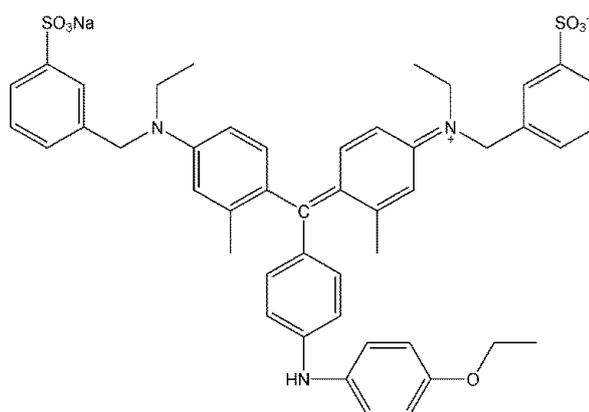


FIGURA 2.2: Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue.

A eficiência das colunas preparadas foi avaliada em três volumes de injeção: 50, 100 e 200 μ L. A coleta das amostras e as medidas espectrofotométricas

foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.3. A FIGURA 2.3 esquematiza o método utilizado. A coleta das frações eluídas foi realizada após a injeção de leite materno centrifugado, sendo a primeira fração de 0 - 2 min e a segunda de 2 - 4 min. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 500 µl de cada uma das frações e a estas foi adicionado o reagente de Bradford. A amostra foi submetida à agitação e depois analisada no espectrofotômetro na região do UV-visível onde foi observada absorção máxima do complexo, proteína-corante, em 596 nm, para todos os volumes injetados.

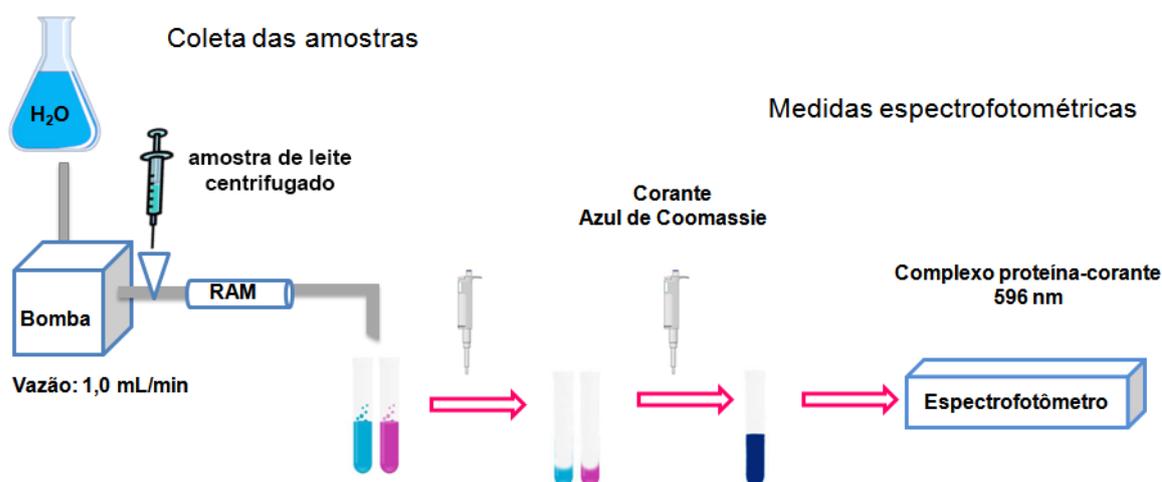


FIGURA 2.3: Esquema do procedimento utilizado para avaliar a eficiência na exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA.

A eficiência na extração das proteínas foi calculada pela comparação das absorbâncias das amostras eluídas pela coluna e coletadas com as amostras de referência que representam a quantidade total das proteínas presentes no leite materno. Tanto a coluna C_{18} quanto a C_8 apresentaram boa capacidade de exclusão nos volumes estudados, com porcentagem de exclusão $\geq 81\%$ para a coluna C_8 e $\geq 92\%$ para a coluna C_{18} , referentes à primeira fração coletada (0 – 2 min). (FIGURA 2.4)

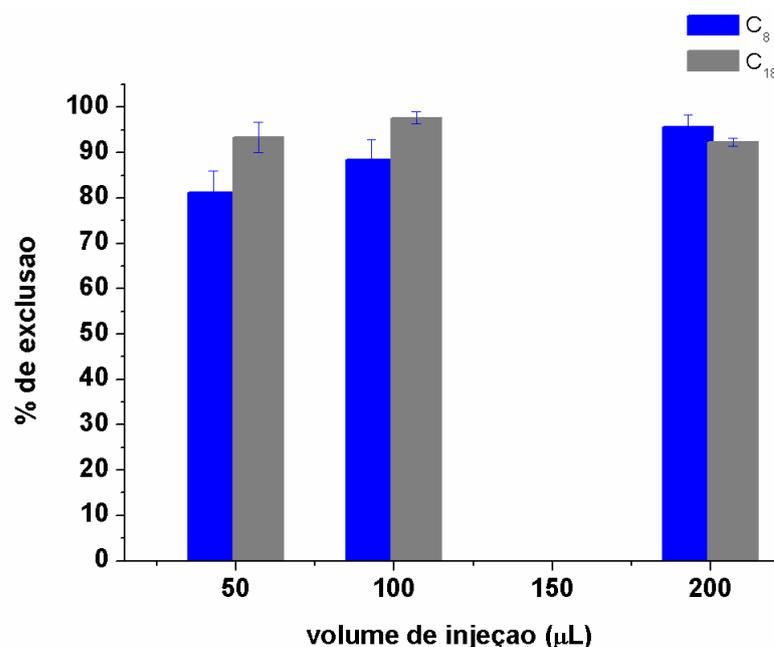


FIGURA 2.4: Porcentagens de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA correspondentes às frações eluídas de 0 – 2 min

Os resultados percentuais obtidos para as duas colunas RAM-BSA estão representados na TABELA 2.2 e demonstraram que estas fases têm excelente poder de exclusão para as proteínas do leite materno, utilizando-se somente água como fase móvel.

TABELA 2. 2: Porcentagens de proteínas do leite materno excluídas das colunas RAM-BSA.

Coluna	Volume leite materno injetado na coluna					
	50 µL		100 µL		200 µL	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
RAM-BSA C ₈	81,2	4,90	88,5	4,32	95,7	2,70
RAM-BSA C ₁₈	93,4	3,32	97,7	1,26	92,4	0,88

Os espectros na região do UV-visível ilustram a sensibilidade do método para os diferentes volumes, de leite materno, injetados e conseqüentemente diferentes concentrações proteicas. (FIGURA 2.5) Os espectros de absorvância obtidos das frações eluídas de 0 - 2 min apresentaram similaridade com o espectro das amostras de referência (100%) sugerindo, qualitativamente, que nas condições avaliadas praticamente toda proteína presente na matriz é excluída da coluna RAM-BSA em apenas 2 min de análise.

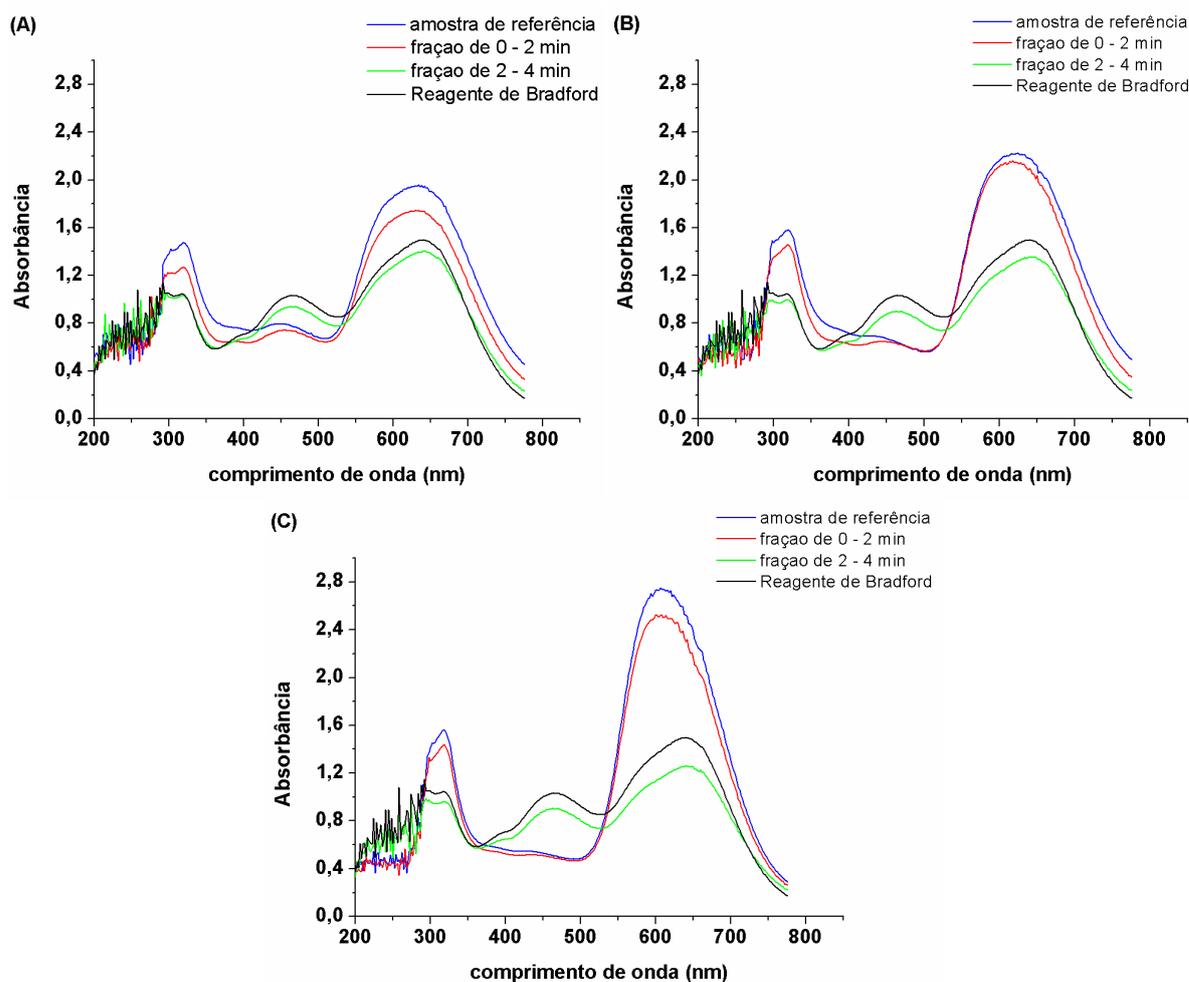


FIGURA 2. 5: Espectros obtidos da reação proteína-corante das amostras de referência e das frações coletadas após eluição na coluna RAM-BSA C₁₈ (A) volume de injeção de 50 µL ; (B) volume de injeção de 100 µL e (C) volume de injeção de 200 .

Os espectros de absorbância, referentes às alíquotas coletadas de 2 – 4 min foram similares ao do próprio corante indicando a ausência quase total de proteínas nesta fração. (FIGURA 2.5) Neste caso, pode-se considerar que a baixa sensibilidade do método para baixas concentrações proteicas prejudicou a análise da segunda fração ou que parte das proteínas ficaram adsorvidas na fase estacionária e/ou nos frits das colunas cromatográficas.¹²⁹

O leite materno possui uma concentração proteica em torno de 9 – 11 g/L, sendo as lactoalbumina, caseína e lactoferrina as presentes em maior concentração. A α -lactoalbumina (14,178 kDa) tem alto valor nutricional com uma composição de aminoácidos adaptada às necessidades dos recém-nascidos e dentre as caseínas a β -caseína (24,000 kDa) é a mais predominante (5 g/L).¹³⁰

A FIGURA 2.6 ilustra o perfil cromatográfico obtido na exclusão das proteínas do leite materno, da α -lactoalbumina e da β -caseína (5 g/L), pela coluna RAM-BSA C₁₈, monitoradas a 280 nm (absorbância dos aminoácidos tirosina, triptano e fenilalanina das proteínas).

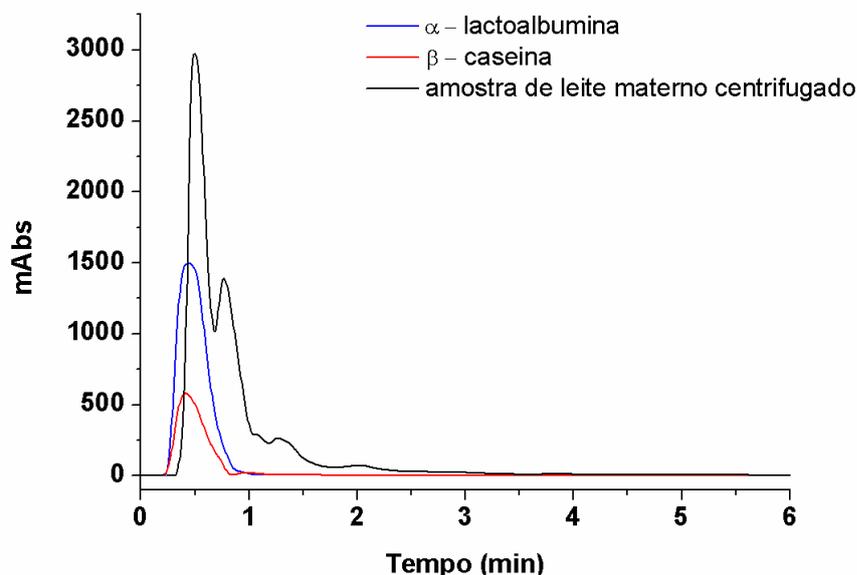


FIGURA 2. 6: Cromatogramas referentes aos perfis de exclusão das proteínas totais do leite materno, da α -lactalbumina e da β -caseína, na coluna RAM-BSA C₁₈. Fase móvel: água 100%, volume de injeção: 100 μ L, vazão: 1,0 mL/min e λ = 280 nm.

Nas condições utilizadas para o estudo de exclusão a BSA apresenta hidrofiliabilidade suficiente para excluir, com eficiência, as proteínas da matriz através de interações repulsivas. O uso de fases móveis em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da albumina (pI = 4,9) pode levar a perda de eficiência da coluna RAM-BSA na exclusão e/ou a precipitação das proteínas presentes no leite, cujos pontos isoelétricos correspondem a 4,2 para α -lactalbumina, 4,6 para β -caseína e 8,7 para lactoferrina.

2.4.2. Desenvolvimento e validação do método

A coluna RAM-BSA C₁₈ mostrou-se como uma excelente alternativa para a injeção direta de leite materno no sistema LC-MS. Sendo assim, foram avaliados e otimizados os seguintes parâmetros para a análise de CBZ e ECBZ: a) retenção dos compostos na coluna RAM-BSA durante a etapa de exclusão; b)

fase móvel de extração e separação dos analitos e c) tempo e fase móvel de limpeza da coluna RAM-BSA.

Por se tratar de cromatografia líquida no modo reverso de eluição deve-se considerar que quanto maior a hidrofobicidade do analito, maior será seu tempo de retenção. Sendo assim, quando compostos ácidos ou básicos se ionizam, eles se tornam menos hidrofóbicos reduzindo seu tempo de retenção. Deste modo, o tempo de retenção de compostos ácidos e básicos varia em função do pH, já os compostos neutros não sofrem alterações neste sentido. ¹³¹

Neste trabalho, o estudo de retenção em função do pH não é justificado pois a faixa de trabalho permitida para colunas com suporte de sílica varia de 3 a 8 e nesta faixa CBZ e ECBZ encontram-se completamente ionizados uma vez que seus pKas são em torno de 13,9. Desta forma, a retenção dos compostos na coluna RAM-BSA C₁₈ nas condições de exclusão das proteínas e a fase de eluição foram investigadas concomitantemente, conforme esquema de válvula ilustrado na FIGURA 2.7. Nesta etapa, uma solução contendo os analitos a 50 µg/mL preparada em água foi injetada no sistema cromatográfico nas condições descritas na TABELA 2.3: 0 – 3 min água 100%; 3 – 15 min fase móvel de transferência MeOH/água e 15 - 20 min água 100%, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 100 µL e $\lambda = 210$ nm.

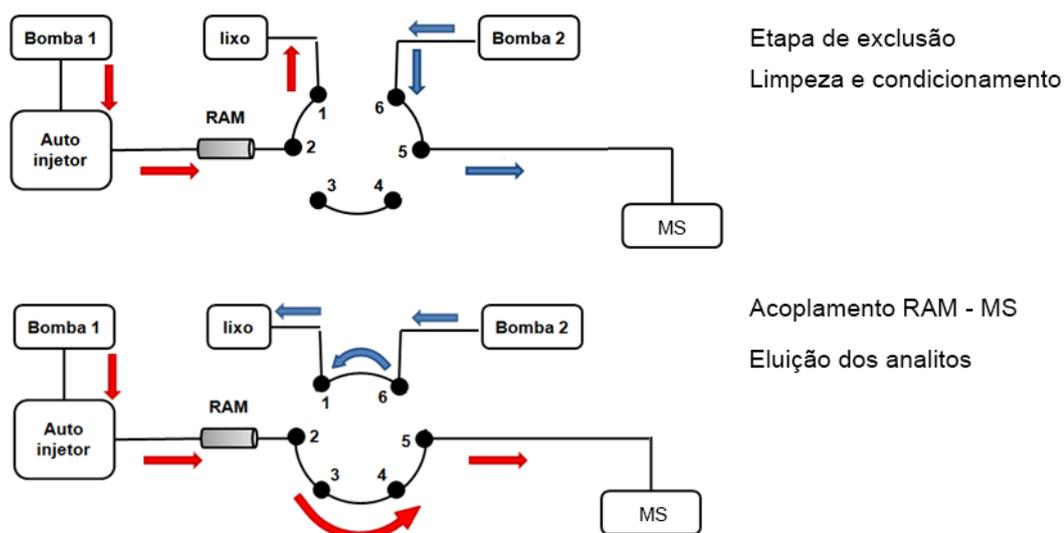


FIGURA 2. 7: Esquema de válvula comutadora utilizado para as análises.

TABELA 2. 3: Condições cromatográficas e eventos.

Tempo (min)	Fase móvel	Evento
0 - 3	Água 100%	Etapa de exclusão
3 - 15	MeOH/água (diferentes proporções)	Acoplamento RAM-MS e eluição dos analitos
15 - 20	Água 100%	Limpeza e condicionamento

De acordo com os resultados obtidos para ambos analitos, nenhuma banda cromatográfica foi verificada no tempo de exclusão das proteínas do leite materno. (FIGURA 2.8) Assim, três proporções de MeOH/água foram avaliadas como fase móvel de extração dos analitos da coluna RAM-BSA. Os resultados mostraram que MeOH/água 70:30 proporciona um intervalo de acoplamento menor porém com separação parcial dos analitos. Já a fase móvel contendo MeOH/água 50:50 promove uma separação satisfatória de CBZ e ECBZ e com isto esta fase móvel foi escolhida para eluição dos analitos na RAM-BSA e acoplamento com o sistema MS, trabalhando com a coluna no modo simples de análise, onde a mesma tem a função de fazer o *clean-up* e separar os compostos.

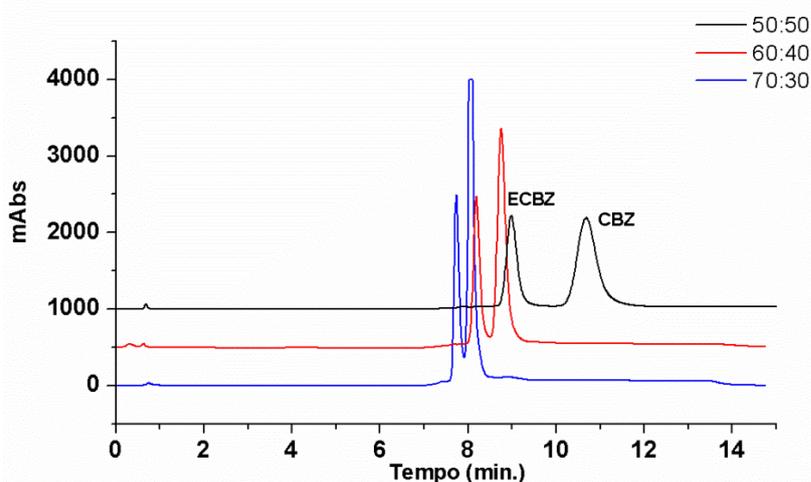


FIGURA 2. 8: Cromatogramas obtidos para a injeção de CBZ e ECBZ em água (50 µg/mL) tendo MeOH/água como fase de extração, vazão: 1,0 mL/min, volume de injeção: 100 µL e $\lambda = 210$ nm.

A análise de amostras biológicas por espectrometria de massa requer uma maior otimização da fase móvel e do tempo de eluição dos analitos a fim de evitar a interferência de compostos endógenos. Desta forma a fase de extração selecionada (MeOH/água 50:50) foi investigada para a análise de CBZ e ECBZ na presença de leite materno. Para esta análise 500 µL de leite materno foram fortificados com uma

mistura de CBZ e ECBZ em uma concentração final de 1,0 µg/mL. Esta análise foi realizada nas seguintes condições cromatográficas: 0 – 3 min água 100%, 3 – 12 min MeOH/água 50:50 e de 12 – 15 min água 100%; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 100 µL e $\lambda = 210$ e 280 nm.

A FIGURA 2.9 demonstra que não há compostos coeluinto no mesmo tempo de retenção dos analitos quando se avalia o cromatograma em 280 nm (utilizado para monitoramento das proteínas), entretanto ao observar o cromatograma em 210 nm (λ escolhido para monitoramento de CBZ e ECBZ) percebe-se que compostos presentes na matriz eluem próximos ao tempo de retenção de CBZ e ECBZ podendo causar efeito de matriz.

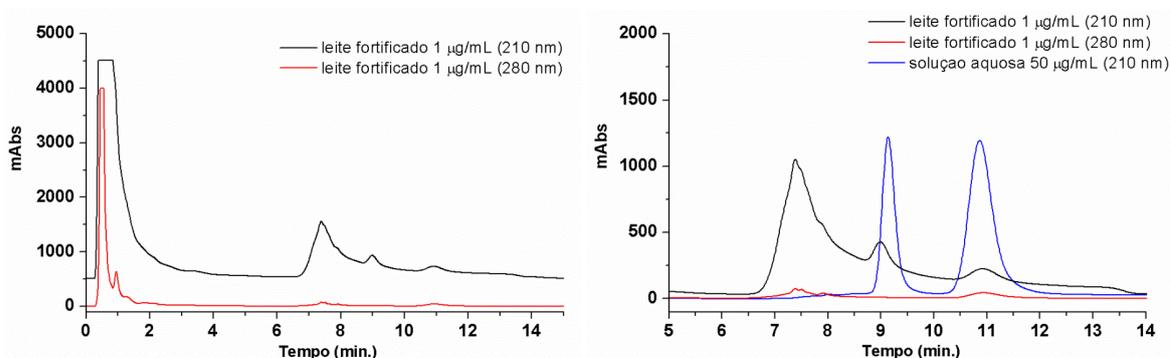


FIGURA 2. 9: Cromatograma obtido na análise de leite materno fortificado com CBZ e ECBZ, avaliados em $\lambda = 210$ e 280 nm.

Considerando a composição do leite materno, acredita-se que os compostos endógenos que eluíram próximos ao tempo de retenção dos analitos sejam oligossacarídeos (HMOs) presentes na matriz. Estes são basicamente divididos em dois grupos: os neutros e os ácidos e em trabalho reportado na literatura uma série de HMOs ácidos foi extraída da matriz com etanol e quantificados utilizando a eletroforese capilar com detecção a 205 nm.¹³² Desta forma, no intuito de evitar a coeluição dos possíveis HMOs e minimizar esta interferência na quantificação de CBZ e ECBZ foi adicionado à fase de exclusão 5% de isopropanol e uma nova análise do leite materno foi realizada no UV a 210 nm. A FIGURA 2.10 mostra o deslocamento da banda próxima ao tempo de retenção dos analitos, evitando assim a coeluição de compostos endógenos que levam a efeito de matriz se no MS.

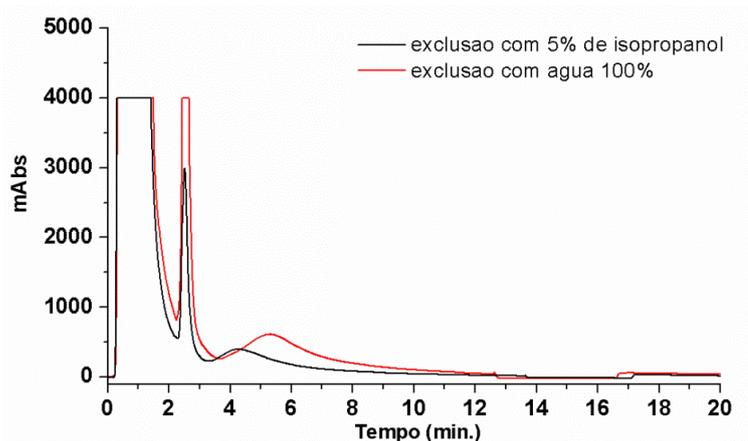


FIGURA 2. 10: Cromatogramas obtidos para a exclusão de componentes do leite materno com água 100% e água/isopropanol 95:5, volume de injeção: 100 μ L e $\lambda = 210$ nm.

Definido a adição de 5% de isopropanol à fase de exclusão, o tempo de acoplamento entre a coluna RAM-BSA e o MS foi novamente avaliado e definido como sendo entre 7,0 – 13,5 min. (FIGURA 2.11)

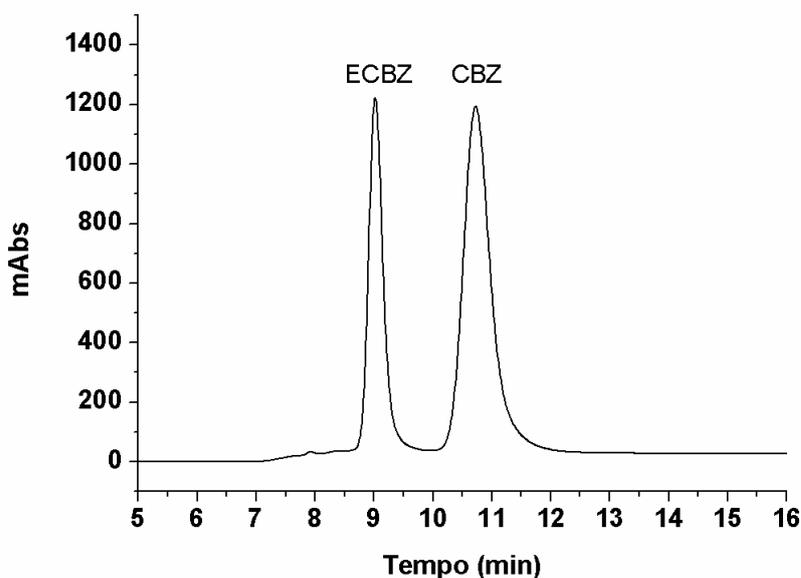
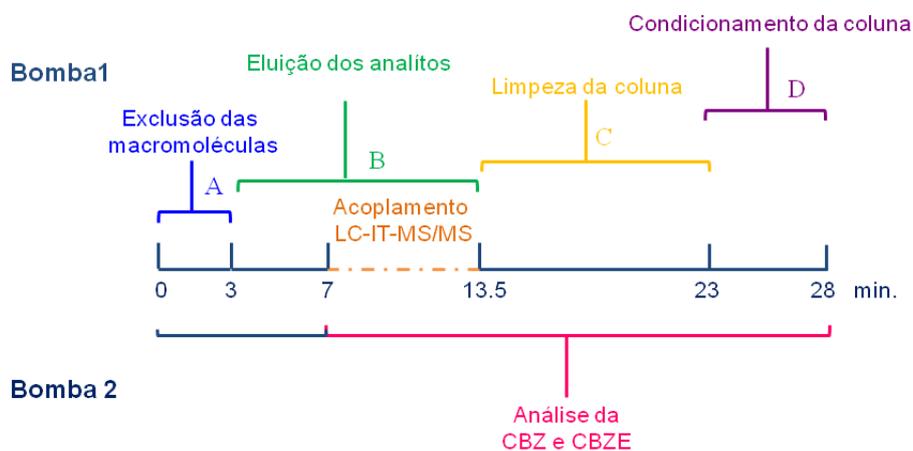


FIGURA 2. 11: Cromatograma obtido para a análise de CBZ e ECBZ para definição do tempo de acoplamento nas seguintes condições: 0 - 3 min água/isopropanol 95:5; 3 - 15 min MeOH/água 50:50; 15 - 25 min ACN/água/isopropanol 75:15:10 e 25 - 30 min água/isopropanol. Vazão: 1,0 mL/min, volume de injeção: 100 μ L e $\lambda = 210$ nm.

A FIGURA 2.12 representa as condições cromatográficas definidas para o método. O tempo e a fase de limpeza da coluna RAM-BSA ficaram definidos como ACN/água/isopropanol 75:15:10 de 13,5 – 23 min e condicionamento da coluna

entre 23 – 28 min com água/isopropanol 95:5. Para as posições da válvula ver FIGURA 2.7.



Bomba 1 :

- (A) Água/Isopropanol 95:5
 - (B) Água/Metanol 50:50
 - (C) Acetonitrila/Água/Isopropanol 75:15:10
 - (D) Água/Isopropanol 95:5
- Vazão: 1,0 mL/min

Bomba 2 :

- Água/Metanol 50:50
- Vazão: 1,0 mL/min com divisor de vazão de 100 µL/min indo para o IT-MS/MS

FIGURA 2. 12: Esquema das condições cromatográficas definidas para o método.

Após estabelecer as condições cromatográficas, as condições ideais de ionização foram determinadas a partir da inserção direta de uma amostra contendo CBZ e ECBZ (100 ng/mL) no espectrômetro de massa. A FIGURA 2.13 mostra o espectro obtido para os analitos e suas fragmentações, nas condições otimizadas que estão apresentadas na TABELA 2.4.

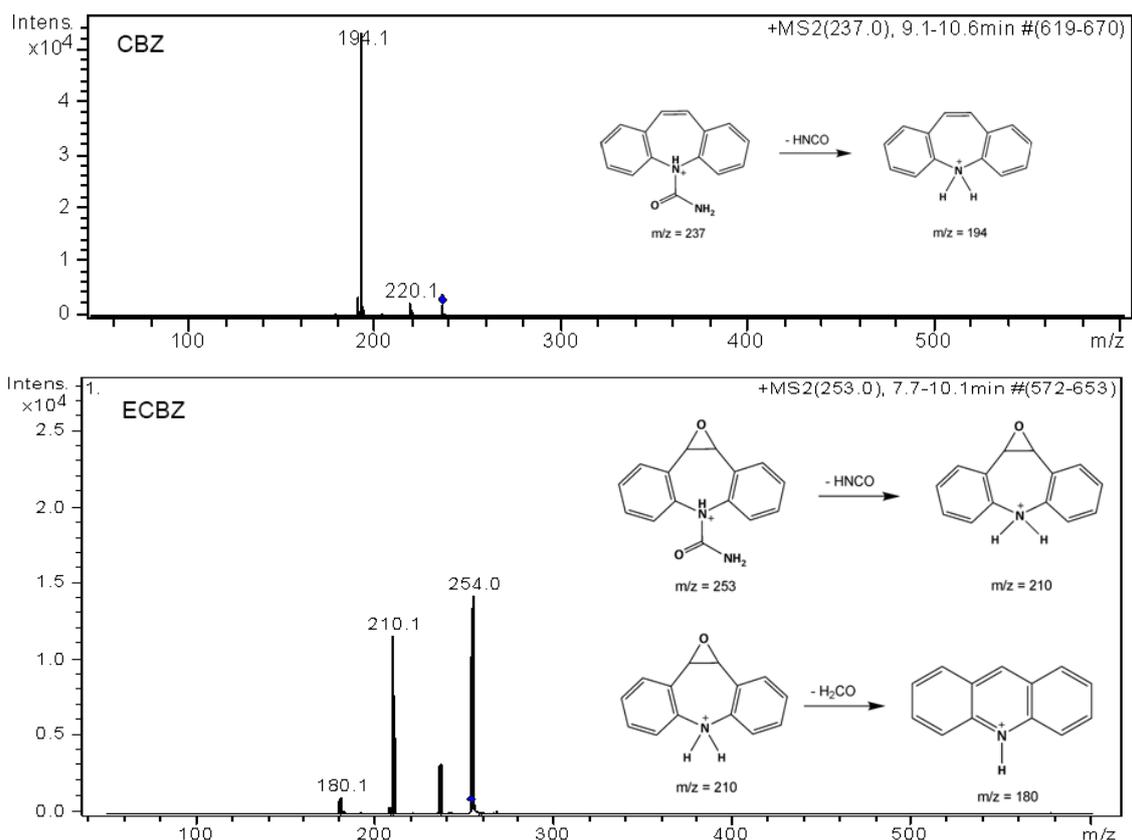


FIGURA 2. 13: Espectros de massa obtidos para CBZ e ECBZ respectivamente.

TABELA 2. 4: Condições ideais de ionização e fragmentação obtidas para CBZ e ECBZ.

Parâmetros de ionização		Composto	Íon precursor (m/z) [M+H] ⁺	Transição SRM (m/z)
Voltagem do capilar (V)	3,50			
Temperatura (°C)	325	CBZ	237	194
Pressão do gás (psi)	25,0		237	192
Vazão do gás (L/min)	6,00	ECBZ	253	210
Amplitude de fragmentação (V)	0,28		253	180
		Padrão interno	239	194

Com as condições cromatográficas e de ionização estabelecidas, o método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios internacionalmente aceitos, ^{126,127} considerando a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), efeito de matriz e estabilidade.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de leite materno, livre dos analitos (leite branco), com análises da matriz biológica fortificada com os analitos. As amostras foram injetadas no sistema LC-MS nas condições estabelecidas e os cromatogramas de íons extraídos estão apresentados na FIGURA 2.14 demonstrando que o método é seletivo e não apresenta interferentes coeluído com os analitos de interesse nas transições monitoradas.

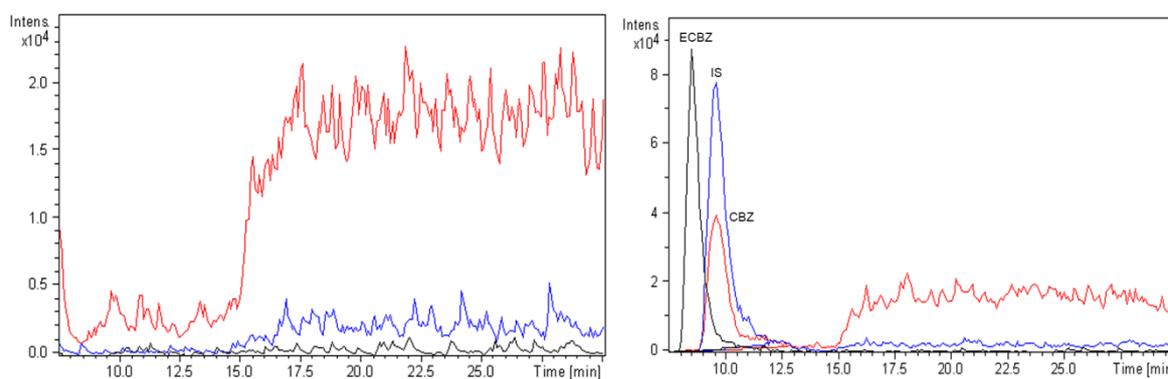


FIGURA 2. 14: Cromatogramas de íons extraídos obtidos para o leite materno branco e leite materno fortificado com 100 ng/mL de cada analito.

Efeito de matriz

Proteínas, lipídios e oligossacarídeos são componentes do leite materno que podem interferir tanto na extração dos analitos da matriz quanto na detecção dos mesmos. As fontes de ionização API têm como inconveniente o impacto negativo gerado pelo efeito de matriz e como não há um protocolo estabelecido para eliminar este problema o efeito de matriz deve ser sempre avaliado durante o desenvolvimento de métodos quantitativos que envolvem detecção por MS/MS.¹³³ Para compensar a influência do efeito da matriz na resposta analítica é bastante comum a utilização de um padrão interno isotópico, uma vez que este possui propriedades físico-químicas idênticas ao do analito de interesse e irá ter o mesmo comportamento durante todo o processo de análise.¹³⁴ Sendo assim, o padrão deuterado da carbamazepina foi submetido aos mesmos experimentos para avaliação do efeito de matriz e posteriormente utilizado na validação do método em uma concentração fixa.

O efeito de matriz foi avaliado qualitativamente através da infusão pós-coluna seguindo esquema representado na FIGURA 2.15 e quantitativamente através da extração *on-line*. O procedimento de infusão pós-coluna mostrou um efeito de supressão na ionização para todos os analitos. (FIGURA 2.16)

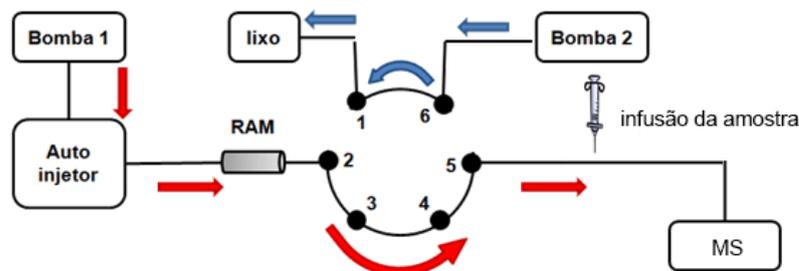


FIGURA 2. 15: Esquema de infusão pós-coluna.

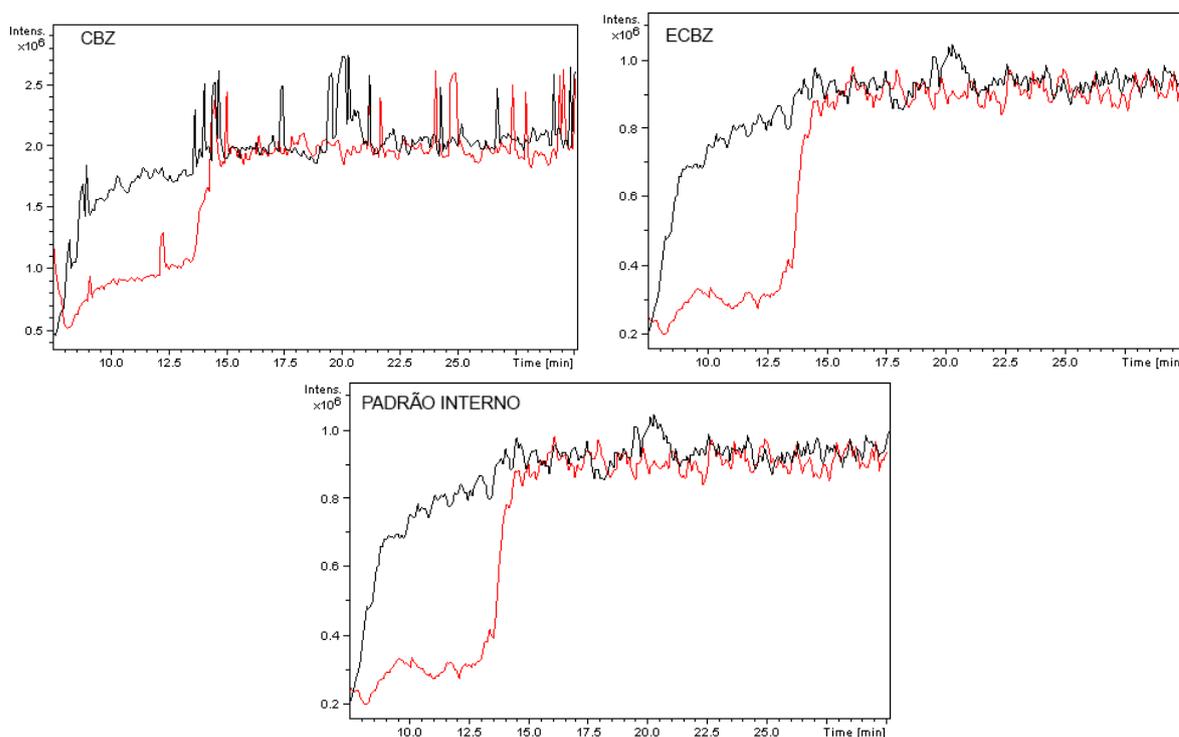


FIGURA 2. 16: Cromatogramas de íons extraídos obtidos na análise do efeito de matriz pós-coluna
 ---- água e ---- leite materno.

Já para o efeito de matriz por extração *on-line* foram preparadas amostras contendo 100 ng/mL de cada composto, inclusive o padrão interno deuterado, em água e em leite materno. O efeito de matriz quantitativo foi avaliado nas duas condições de exclusão, ou seja, com água 100% de 0 – 3 min e com

água/isopropanol 95:5 de 0 – 3 min. Em ambas as condições de exclusão houve supressão na ionização de todos os compostos, entretanto ao se comparar as duas fases de exclusão pode-se observar que um menor efeito de supressão foi obtido utilizando-se 5% de isopropanol.. (FIGURA 2.17) Os valores obtidos para o efeito de matriz utilizando água/isopropanol 95:5 na exclusão, calculados a partir da comparação entre as áreas dos analitos em leite pela área dos analitos em água e expressos em porcentagem, estão apresentados na TABELA 2.5.

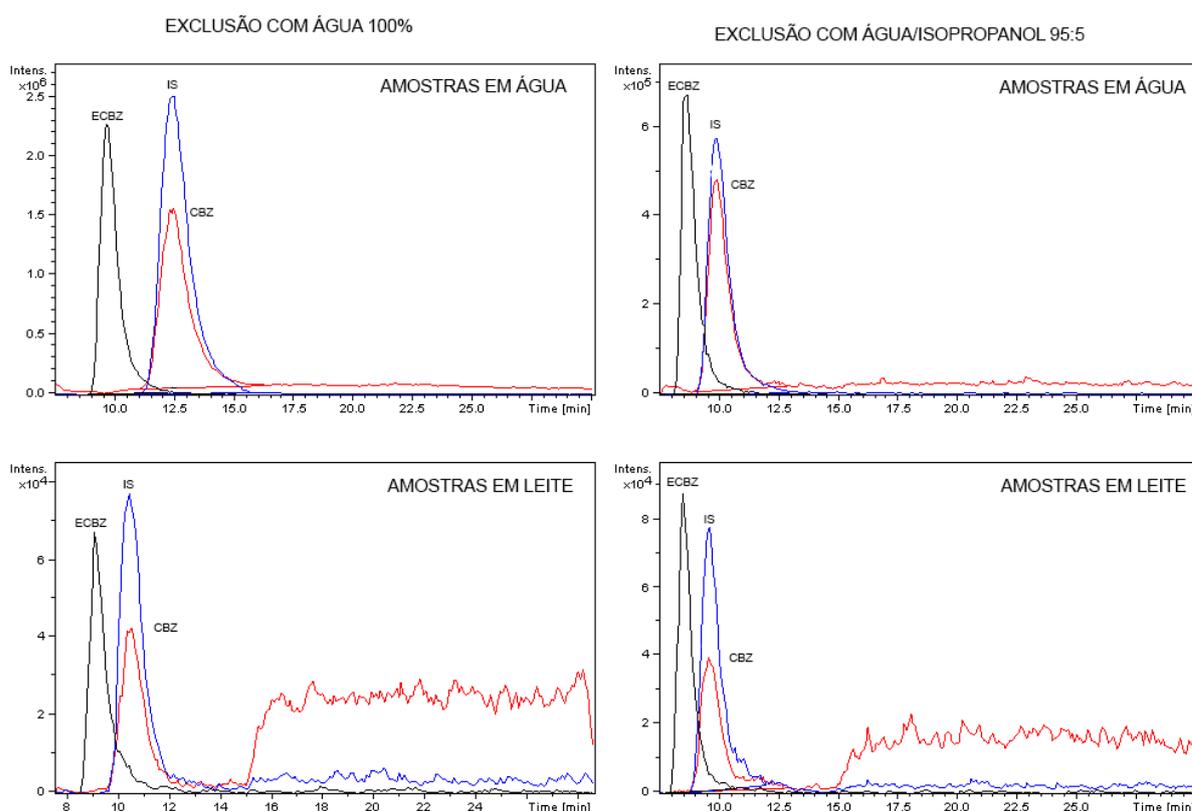


FIGURA 2. 17: Cromatogramas de íons extraídos obtidos na análise do efeito de matriz por extração on-line.

TABELA 2. 5: Valores obtidos para o EM com fase de exclusão água/ISO 95:5.

Composto	Efeito de matriz (área leite/área água)x100
CBZ	8,75%
ECBZ	5,71%
Padrão interno	3,17%

Linearidade

As curvas de calibração foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: CBZ – 25,0; 75,0; 150; 225; 450 e 600 ng/mL e ECBZ – 50,0; 100; 300; 450; 900 e 1200 ng/mL. As amostras foram preparadas em leite materno, em triplicata e foram injetados 100 µL. As curvas analíticas foram obtidas através de regressão polinomial (FIGURA 2.18), este modelo matemático foi o que proporcionou ao método melhor precisão e exatidão.

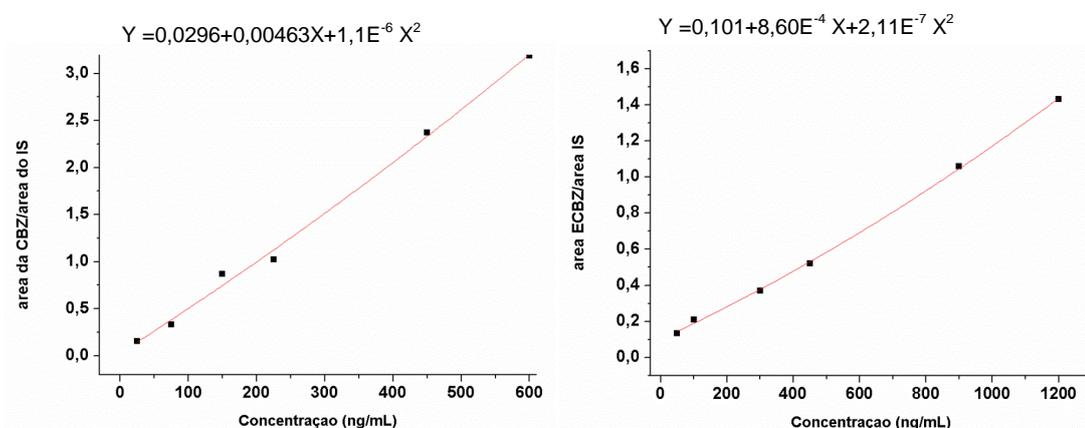


FIGURA 2. 18: Curvas analíticas obtidas para CBZ e ECBZ.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98 e estão representados na TABELA 2.3 juntamente com os valores de LD, LQ e as respectivas equações das curvas geradas. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foram $\leq 20\%$, e a exatidão apresentou um desvio $\leq 20\%$ do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos. ¹²⁷

TABELA 2. 6: Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método.

Analito	Faixa de concentração (ng/mL)	Equação da curva	R^2	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
CBZ	25 – 600	$Y = 0,0296 + 0,00463X + 1,1E^{-6} X^2$	0,997	20	25
CBZE	50 – 1200	$Y = 0,101 + 8,60E^{-4} X + 2,11E^{-7} X^2$	0,999	40	50

As figuras de mérito avaliadas foram realizadas com amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, em três níveis de concentrações (baixo, médio e alto), em relação às concentrações da curva de calibração. Os LQs foram as primeiras concentrações das curvas de calibração e os valores obtidos foram de 25,0 e 50,0 ng/mL para CBZ e ECBZ, respectivamente. Os valores de LD foram de 20,0 ng/mL para CBZ e de 40 ng/mL para ECBZ. Estes valores estão próximos aos reportados na literatura para estes analitos em amostras de plasma.¹³⁵

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intra-lote e inter-lotes foram avaliadas analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade, em um mesmo lote e em lotes diferentes. Estes dados estão representados na TABELA 2.4, onde a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas.

TABELA 2. 7: Precisão, exatidão, média entre lotes (n = 5), inter-lotes (n = 15), e eficiência do processo de extração (EP).

Composto (ngmL ⁻¹)	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média (3 lotes)		EP (%)
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	
CBZ									
30	86,1	13,4	112	16,4	97,7	5,40	98,4	11,7	78,2
250	96,4	10,5	82,5	7,02	88,1	9,30	89,0	8,90	105
500	85,9	10,9	91,2	11,4	83,1	11,2	86,7	11,2	104
CBZE									
60	122	18,0	104	20,0	95,5	20,7	98,1	19,6	87,2
500	114	12,6	116	14,3	118	9,53	110	12,1	102
1000	115	17,1	107	7,7	85,2	5,96	116	10,2	91,9

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação entre 5,40 e 20,0 considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 82,5 e 122% das concentrações nominais. Os valores estão dentro dos critérios de aceitação para validação de métodos bioanalíticos, considerando especialmente que o preparo da amostra incluiu uma etapa de *standby*, permitindo que o equilíbrio entre os analitos e a matriz fosse alcançado. Esta etapa foi determinada, uma vez que uma alta variabilidade na resposta dos analitos entre as replicatas foi observada. Este procedimento foi adotado por Rezk *et al*¹³⁶ durante o desenvolvimento de um método para a análise de antiretrovirais em leite materno.

Os dados da eficiência de extração também estão apresentados na TABELA 2.4 e compreendem uma faixa de 78,2 – 105%, para ambos analitos. Estes resultados foram determinados através da razão entre as áreas das amostras preparadas em leite materno (n=5) e as áreas das amostras preparadas em água (n=5), nos três níveis de CQ. Estes resultados demonstraram uma pequena influência na extração das concentrações mais baixas que pode estar relacionado à etapa de *standby*, ao efeito de matriz ou à própria extração do analito da coluna RAM-BSA. A estabilidade das amostras fortificadas foi avaliada por dois ciclos de degelo e se mostraram estáveis por 48 h.

Aplicação do método

A aplicação do método foi demonstrada a partir da análise de uma amostra de leite materno obtida de uma doadora em tratamento com carbamazepina. A amostra foi coletada 8 h após administração oral de 200 mg do medicamento. Após diluição de 100 µL da amostra em 900 µL de leite branco e adição do padrão interno (n=3), CBZ e ECBZ foram quantificadas em 226 ng/mL (CV = 5%) e 154 ng/mL (CV = 15%), o que corresponde a uma concentração absoluta de 2,26 e 1,54 µg/mL, respectivamente. A FIGURA 2.19 apresenta o cromatograma de íons extraídos obtido para CBZ e seu metabólito majoritário e seus respectivos espectros de massa utilizados na identificação dos mesmos. Os resultados obtidos estão de acordo com as concentrações reportadas na literatura.¹¹⁸

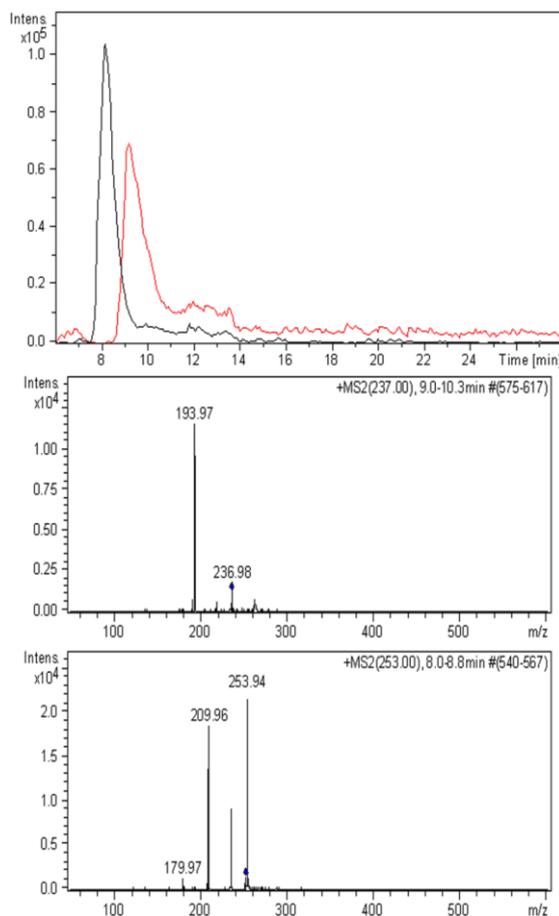


FIGURA 2. 19: Cromatograma de íons extraídos obtidos para a amostra de uma doadora e os respectivos espectros de massa de CBZ e ECBZ.

2.5 Conclusões

O presente trabalho reportou o desenvolvimento, validação e aplicação de um método com injeção direta de amostra no sistema LC-IT-MS/MS para quantificação inequívoca de carbamazepina e seu metabólito principal em leite materno.

A coluna RAM-BSA estudada mostrou-se eficiente para a exclusão das proteínas do leite materno assim como de possíveis oligossacarídeos que compõem a matriz. Sua performance no *clean-up* das amostras proporcionou a redução do efeito de matriz comumente observado na análise de amostras biológicas por LC-MS com fontes de ionização do tipo ESI.

O emprego da RAM-BSA no *clean-up* da amostra e na separação dos analitos foi bastante satisfatório. A qualidade do desempenho da coluna RAM-BSA C₁₈ foi mantido após 500 injeções (100 µL cada) de leite materno centrifugado.

O método desenvolvido foi validado com baixos limites de detecção e quantificação e com boa exatidão e precisão. Sendo assim, sua aplicação foi realizada com sucesso demonstrando que o método pode ser utilizado para o monitoramento de carbamazepina e seu metabólito em análises de rotina.

Capítulo 3

Quantificação de Fluoxetina e Norfluoxetina em Leite Materno Utilizando a 2D LC-MS/MS

Quantificação de Fluoxetina e Norfluoxetina em leite materno utilizando a 2D LC-MS/MS.

3.1 Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde a depressão tem sido considerada como a doença de maior incidência em mulheres. Em particular, a idade fértil é considerada o momento mais vulnerável para o início da depressão e no período pós-parto chega a atingir de 12 a 16% das parturientes. Apesar da repercussão negativa e bem conhecida da depressão materna para o bem estar do bebê a maioria das mulheres consideram os sintomas depressivos no pós-parto como sendo natural e geralmente relutam em procurar um tratamento.¹³⁷

De acordo com Hatton *et al*,¹³⁸ as mães depressivas estão mais propensas a interromper a amamentação precocemente e, considerando todos os benefícios já relatados em relação à amamentação, muitas vezes o uso de fármacos apresenta-se como a melhor alternativa para o tratamento da depressão pós-parto. No entanto, as informações a respeito da segurança dos antidepressivos, tanto os tricíclicos quanto os de nova geração, durante o período de lactação ainda são inespecíficas, pois os estudos reportados na literatura fornecem poucos dados tornando-se difícil tirar conclusões definitivas.¹³⁹

A fluoxetina (FLU), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (SSRI), é uma base orgânica lipofílica (pKa = 9,5) geralmente administrada como mistura racêmica. (FIGURA 3.1) O pico de nível sérico é atingido entre 6 e 8 horas após administração oral e é metabolizada no fígado pela CYP2D6 ao seu metabólito primário norfluoxetina (NOR) também presente nas formas S- e R-.^{140,141} FLU e NOR possuem farmacocinética e potencial farmacológico similares. Ambas são rapidamente distribuídas nos tecidos e altamente ligadas às proteínas do plasma ($\leq 95\%$). Seus respectivos tempos de meia vida são de 1 a 4 dias e de 7 a 15 dias.¹⁴⁰ Desde o seu lançamento no mercado em 1989, a excreção de FLU no leite materno vem sendo investigada, entretanto, o número de estudos que reportam as concentrações encontradas no leite e seus efeitos colaterais no bebê ainda é bastante limitado.^{140,142}

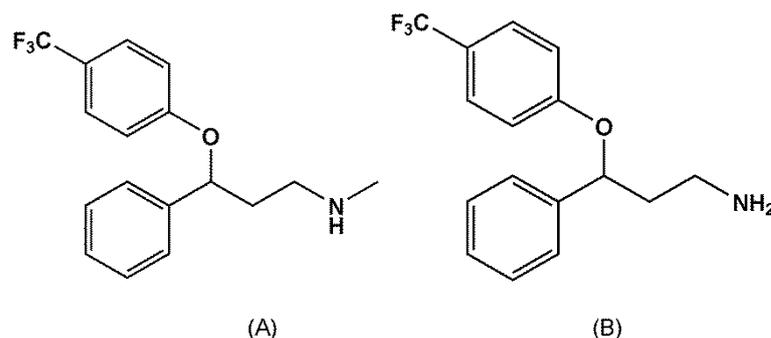


FIGURA 3. 1: Estrutura da (A) Fluoxetina e (B) Norfluoxetina.

TABELA 3. 1: Propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos da FLU e NOR.^{117,143}

Propriedades	Fluoxetina	Norfluoxetina
Peso molecular	309,32 g/mol	295,29 g/mol
Lipossolubilidade (log p)	4,05	3,8
Ligação com as proteínas	95%	95%
Grau de ionização (pKa)	9,8	9,7
Tempo de meia-vida	50 h	240 h
Biodisponibilidade	80%	-
Concentração plasmática máx.	200 – 531 ng/mL	103 -465 ng/mL
T máx.	6 – 8 h	-

Taddio *et al*, reportou uma média da dose infantil, calculada para 11 lactantes, de 77 µg/dia para FLU e 54 µg/dia para NOR. Neste estudo foram relatados efeitos colaterais tais como, irritabilidade, disfunção gastrointestinal, fadiga e insônia.¹⁴⁰ Entretanto, este e outros estudos que reportam a quantidade de fluoxetina ingerida pelo bebê e seus efeitos colaterais não conseguem representar o cenário mundial.¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ Esta limitação advém não só dos métodos de quantificação que em geral trabalham com extração líquido-líquido e detecção por UV, mas principalmente devido à quantidade de amostras reais analisadas em cada estudo.

Como dito anteriormente, o efeito de matriz caracterizado pela presença de endógenos na matriz biológica, pode comprometer a eficiência de métodos bioanalíticos por LC-MS. Sendo assim, recentemente algumas estratégias têm sido investigadas na tentativa de reduzi-lo ou eliminá-lo. Neste contexto, as modificações cromatográficas vêm sendo empregadas com sucesso na melhoria do efeito de matriz.⁸⁸

O uso de partículas cada vez menores para obter melhor eficiência e resolução vem sendo uma tendência. Com o emprego de partículas $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ganha-se em velocidade e capacidade de pico o que reflete em análises mais rápidas e com maior sensibilidade. Este é o contexto da UHPLC, que trabalha com partículas sub- $2 \mu\text{m}$ e fase móvel com alta velocidade linear e por isso necessita de um sistema capaz de operar em altas pressões ($\geq 15000 \text{ psi}$).¹⁵⁰ A eficiência cromatográfica obtida com o uso das partículas sub- $2 \mu\text{m}$ proporciona a separação entre os analitos e os compostos endógenos praticamente eliminando o efeito de matriz.^{88,151} Outra alternativa bastante eficiente na separação cromatográfica são as colunas com partículas *fused core* que também proporcionam separações rápidas e com alta eficiência tendo a vantagem de serem utilizadas tanto em sistemas convencionais de LC como em UHPLC.

Considerando que uma alta resolução cromatográfica reduza drasticamente o efeito de matriz, outra ferramenta promissora tem sido a cromatografia multidimensional.⁸⁸ Pascoe *et al*,¹⁵² avaliaram diferentes combinações de colunas no modo 2D no intuito de investigar a capacidade de redução do efeito de matriz em diversas matrizes biológicas.

Sendo assim, o presente trabalho reporta o desenvolvimento, a validação e a aplicação de um método 2D LC-MS/MS para a quantificação de fluoxetina e norfluoxetina em leite materno.

3.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolvimento de um método cromatográfico para quantificação de fluoxetina e norfluoxetina utilizando a 2D LC-LM/MS.

- Avaliação da miniaturização das colunas RAM-BSA na exclusão das proteínas do leite materno;
- Avaliação do acoplamento 2D LC-MS com colunas com partículas sub- $2 \mu\text{m}$ e *fused core*

3.3 Experimental

3.3.1 Generalidades

Todos os solventes orgânicos, grau HPLC, foram adquiridos da Mallinckrodt Baker (St Louis, EUA). A água usada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). O padrão de FLU foi doado pelo Instituto de Vita Nova (Hortolândia, Brasil) e NOR foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções estoque padrão foram armazenadas a -20°C. Todos os outros reagentes foram de grau analítico. Pool de leite materno foi fornecido pelo banco de leite materno da maternidade Dona Francisca Cintra Silva, do São Carlos, SP, Brasil. O uso destas amostras foi aprovado pelo Comitê de ética humano da Universidade Federal de São Carlos. As amostras de leite foram armazenadas em alíquotas de 2,0 mL a -20°C.

3.3.2 Preparo da coluna RAM-BSA em escala microbore.

O preparo das colunas de 30 x 2,1 mm foi realizado de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2, ajustando-se apenas a quantidade de fase móvel eluída durante o preenchimento do tubo.

A imobilização da BSA por cromatografia frontal também seguiu o método baseado no procedimento de Menezes e Felix,¹²⁴ e detalhado no capítulo anterior. Devido ao diâmetro interno da coluna a vazão da fase móvel (0,5 mL/min) e o volume dos reagentes foi ajustado.

3.3.3 Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno

A análise da capacidade de exclusão proteica foi baseada no método de Bradford,¹²⁵ como descrito anteriormente para as colunas RAMs em escala convencional ajustando-se apenas os volumes de coleta e de preparo considerando-se as características da coluna.

Após condicionamento com H₂O a 400 µL/min o leite materno centrifugado foi injetado no sistema e duas frações foram coletadas em tubos de ensaio. A primeira fração correspondeu ao tempo de eluição de 0 - 1 min e a segunda fração de 1 - 2 min. Para a limpeza de possíveis compostos endógenos e lipídios presentes na matriz foi eluída pela coluna fase móvel de limpeza numa proporção de ACN/H₂O/ISO 75:15:10 (v/v/v) durante 5 min e para condicionamento e nova injeção H₂O por 5 minutos, ambas a 400 µL/min.

A coleta das frações foi realizada em triplicata para os volumes de injeção de 2,5; 5,0 e 10 µL de leite materno. As soluções de referência foram preparadas adicionando-se 2,5; 5,0 e 10 µL de leite materno (pool centrifugado) e completando-se o volume de 400 µL com H₂O deionizada com o auxílio de uma micropipeta (Gilson, 1000 µL). A quantidade de proteínas totais presente no eluente foi estimada a partir da razão entre a absorbância das soluções de referência de leite (100%) e a absorbância das amostras coletadas.

As análises do perfil de exclusão proteica do leite materno e o procedimento de coleta foram realizadas num sistema cromatográfico de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA) composto por uma bomba binária (BSM), uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C, acoplado a um detector de UV-vis Waters modelo TUV operando a 206 e 280 nm. A aquisição dos dados foi feita utilizando-se o software MassLynx.

Para as medidas de absorção foram adicionados diretamente às amostras (400 µL) 1,5 mL do reagente de Bradford. Após 30 s de agitação no vórtex, a amostra foi deixada em repouso por 5 min para a formação do complexo e em seguida foi transferida para uma cubeta de quartzo e os espectros foram registrados na região de 190 a 800 nm. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 596 nm, referente à máxima absorbância do complexo proteína-corante. Todas as amostras coletadas e de referência foram submetidas a este procedimento.

As medidas de absorção molecular na região do UV-visível foram realizadas em um espectrofotômetro Jasco V-630 utilizando-se uma cubeta de vidro de 10 mm de caminho óptico.

3.3.4 Desenvolvimento do método

Sistema 2D LC-MS/MS

Sistema cromatográfico de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA) composto por uma bomba binária (BSM), uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C e sistema de válvulas comutadoras de seis caminhos especialmente configuradas para extração *on-line* (válvula Valco® VICI para injeção e 2 válvulas Everflow® para acoplamento das duas dimensões) acoplado a um detector de UV-vis Waters modelo TUV operando a 210 e 280 nm. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa modelo Xevo TQ-MS (Waters, Milford, USA) com ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo para análise de fluoxetina e seu metabólito.

Para a otimização das condições de ionização soluções aquosas, individuais de cada composto (100 ng/mL), foram infundidas no sistema no modo *combined* com vazão de 300 µL/min de ACN:água (70:30 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 20 µL/min da bomba seringa contendo as soluções aquosas. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 2,5 kV; voltagem do cone: 10 V; temperatura de dessolvatação: 600 °C; vazão do gás de dessolvatação: 800 L/Hr. As energias de colisão (EC) e voltagem do cone para cada um dos compostos foram otimizadas através do software MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart.

O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) e duas transições de cada analito foram selecionadas para quantificação e confirmação, 310,2 > 44,0 (cone 12 V; EC = 10 eV) e 310,2 > 148,1 (cone 18 V; EC = 8 eV) para FLU; 296,2 > 134,1 (cone 12 V; EC = 6 eV) e 296,2 > 29,9 (cone 12 V; EC = 6 eV) para NOR.

A coluna RAM-BSA C₁₈ foi usada na primeira dimensão do sistema cromatográfico com a finalidade de excluir as macromoléculas da matriz e fazer a pré-concentração dos analitos. Para análise de FLU e NOR na segunda dimensão foram testadas as seguintes colunas: Acquity UPLC BEH fenil (1,7 µm, 2,1 x 100 mm), Acquity UPLC BEH C₈ (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) e Ascentis Express® fenil hexil (2,7 µm, 2,1 x 100 mm).

Preparo das soluções de trabalho

Soluções estoque de FLU (15,0 µg/mL) e NOR (20,0 µg/mL) foram preparadas em ACN. Para as soluções de calibração e de controle de qualidade (CQ), 10 soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque, nas seguintes concentrações de calibração: 0,150; 0,750; 1,50; 2,25; 4,50; 6,75 e 7,50 µg/mL para o FLU e 0,200; 1,00; 2,00; 3,00; 6,00; 9,00 e 10,0 µg/mL para NOR; e amostras QC: 0,300; 3,00 e 6,00 µg/mL para FLU e 0,400; 4,00 e 8,00 µg/mL para NOR. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C.

As concentrações das soluções de CQ foram definidas de acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos recentemente publicado pela *European Medicines Agency* (EMA),⁸⁹ onde CQ baixo deve ser de até 3 vezes o valor da concentração mais baixa da curva de calibração (LQ), CQ médio deve estar entre 40 – 60% da concentração mais alta da curva de calibração e CQ alto encontra-se entre 75 – 95% da concentração mais alta da curva de calibração.

Preparo das amostras

Para o preparo das amostras fortificadas alíquotas de 10,0 µL da solução de trabalho foram adicionadas a 450 µL de leite materno. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 s, mantidas em repouso por 10 min à temperatura ambiente, para que os analitos atingissem um estado de equilíbrio com os componentes da matriz, e em seguida foram acrescentados 40,0 µL de isopropanol e 5,00 µL ácido fórmico, para melhorar a resposta do sinal. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm, 4°C por 15 min, resultando em uma camada fina de gordura, uma camada aquosa intermediária e um pequeno precipitado no fundo do tubo. Após este procedimento 350 µL da fração aquosa foram transferidos para os vials e destes 10 µL foram injetados no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS. As amostras de calibração foram preparadas em triplicata enquanto as amostras QC foram preparadas em quintuplicata.

Validação do método

A validação do método foi realizada de acordo com os critérios internacionalmente aceitos,⁸⁹ considerando a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), efeito de matriz e estabilidade.

A seletividade do método foi assegurada pela análise individual de amostras de leite materno branco e leite materno fortificado com FLU e NOR.

Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram determinados utilizando-se amostras de leite fortificado preparadas em triplicata. Foi considerado como LOD como sendo o mínimo de analito detectável com a relação sinal-ruído (S/N) de três. O LOQ foi considerado nível mais baixo de calibração e o critério aceito para sua determinação foi um CV entre 15 e 20%, entre as replicatas.

Para determinar a linearidade, seis amostras de leite branco foram fortificadas em triplicata em sete níveis de concentração (3,0; 15,0; 30,0; 45,0; 90,0; 135 e 150 ng/mL para o FLU; 4,00; 20,0; 40,0; 60,0; 120; 180 e 200 ng/mL para NOR) e analisados. A curva gerada foi submetida a um tratamento matemático de regressão linear com intercepto = 0 ($y = bx$) para FLU e regressão linear ($y = a + bx$) para NOR, considerando-se a relação entre a área da banda cromatográfica e a concentração do analito.

Precisão e exatidão intra e inter lotes foram avaliadas em 3 lotes, utilizando-se as amostras de CQ (6,00; 60,0 e 120 ng/mL para o FLU; 8,00; 80,0 e 160 ng/mL para NOR) preparadas em quintuplicata. A precisão foi expressa como o coeficiente de variação (%CV) entre as replicatas. A exatidão do método, expressa em porcentagem, foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas para as replicatas e o valor das concentrações nominais.

A eficiência do processo de extração (recuperação) foi calculada através da comparação entre as áreas da banda cromatográfica das amostras em de CQ preparadas em água (100%) e em leite materno.

O efeito de matriz foi avaliado apenas por extração *on-line* utilizando-se o método descrito no guia de validação da EMA.⁸⁹ Neste procedimento 8 amostras de indivíduos diferentes e em períodos de lactação distintos foram fortificadas nas

concentrações estabelecidas para os CQ baixo e CQ alto. O efeito de matriz foi calculado através do coeficiente de variação (%CV) entre as amostras injetadas.

A estabilidade dos analitos na matriz foi avaliada fortificando-se amostras de leite branco, nas concentrações dos CQs. Estas amostras foram analisadas imediatamente após o preparo e em seguida armazenadas a - 20°C. Após 24 horas as amostras foram descongeladas e analisadas e assim sucessivamente por ciclos de degelo de 24 horas, 7 dias, 21 dias e 60 dias.

Aplicação do método

Para a aplicação do método foram coletados 10 mL de leite materno de uma doadora em tratamento com 40 mg/dia de fluoxetina. A coleta foi realizada 4 h após a administração oral da dose do medicamento.

Para a quantificação de FLU e NOR nesta amostra foram utilizadas as curvas de calibração construídas. As amostras foram preparadas em triplicata e a elas foram adicionados 50 µL de ISO e 5 µL ácido fórmico, em seguida estas foram homogeneizadas e submetidas à centrifugação nas condições estabelecidas no preparo de amostra.

3.4 Resultados e Discussão

Apesar da coluna RAM-BSA ter apresentado um excelente desempenho no modo simples de análise (capítulo 2), as vantagens oferecidas pela 2D LC-LC, tais como: aumento da capacidade de pico, da seletividade e da resolução; motivou o seu uso na quantificação da fluoxetina e seu metabólito principal em leite materno.

Os sistemas 2D LC-LC *on-line* são bastante atrativos, uma vez que apresentam reprodutibilidade, perda mínima de amostra, redução da contaminação, possibilidade de automação e análises com alto rendimento.¹⁵⁰ No entanto, a otimização de diversos parâmetros deve ser levada em consideração durante o desenvolvimento de métodos 2D LC-LC *on-line*. A compatibilidade entre as duas dimensões do sistema deve ser avaliada em relação à fase móvel, vazão, tubulações e conexões/válvulas. Além disso, a capacidade de pico pode ser

maximizada a partir de uma avaliação criteriosa do tipo de coluna, suas dimensões, tamanho das partículas, composição e vazão da fase móvel.¹⁵³

Em sistemas multidimensionais acoplados a um espectrômetro de massa é recomendável que o desenvolvimento do método seja iniciado pela otimização das condições de análise na segunda dimensão, com o intuito de atender as exigências necessárias para melhor desempenho das fontes de ionização.¹⁵³

Sendo assim, para estabelecer a melhor configuração do sistema 2D LC-MS empregado na análise de fluoxetina e norfluoxetina com injeção direta de leite materno, foi necessário avaliar os seguintes parâmetros:

- perfil de exclusão proteica pela coluna RAM-BSA;
 - tempo de exclusão das proteínas
 - fase móvel de exclusão proteica
 - retenção dos analitos nestas condições
- condições de ionização dos analitos;
- condições de extração e transferência dos analitos;
 - fase móvel de eluição dos analitos da coluna RAM
 - fase móvel de transferência dos analitos para a segunda dimensão
 - tempo de acoplamento entre as duas dimensões
 - fase móvel de limpeza da primeira dimensão
- condições de separação dos analitos na segunda dimensão

3.4.1 Desenvolvimento do método

A química verde tem sido uma tendência global e seus princípios podem ser aplicados a todas as áreas da química. Dentro deste contexto, a cromatografia verde visa à redução do volume de solvente utilizado, minimizando a quantidade de resíduos gerados.¹⁵⁴ Uma das alternativas escolhidas para a redução no consumo de solvente sem que haja perda de eficiência é a redução da vazão cromatográfica. Sendo assim, nas últimas décadas uma das estratégias adotadas foi o desenvolvimento de versões miniaturizadas da LC convencional. Quando o d.i. da coluna é reduzido, a vazão também deve ser escalonada (equação 3.1) para que a velocidade ótima de trabalho seja atingida e, conseqüentemente, o número de pratos teóricos máximo seja obtido.¹⁵⁴ (equação 3.2)

(3.1)

(3.2)

Com a redução do diâmetro interno da coluna cromatográfica ocorre uma menor dispersão dos analitos na fase móvel e, assim um aumento na sensibilidade pode ser observado.¹⁵⁰ A TABELA 3.2 apresenta a classificação utilizada em LC relacionados ao d.i., e as respectivas vazões ideais para as diferentes escalas.

TABELA 3. 2: Relação entre d.i. e o consumo de solvente.²¹

Nomenclatura	Diâmetro interno (mm)	Vazão (µL/min)
LC-convencional	4,6	1000
	4,0	750
	3,0	430
LC-microbore	2,1	210
	2,0	190
micro-LC	1,0	47
LC-capilar	0,5	11
nano-LC	0,1	0,5

Perfil de exclusão proteica pela coluna RAM-BSA em escala *microbore*

Diante da robustez, devidamente fundamentada, das colunas RAM-BSA na injeção direta de amostras biológicas,^{9,27,64} associada às vantagens das colunas em escala *microbore*, foi preparada e avaliada uma coluna RAM-BSA C₁₈ de 30 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro interno.

Desde a última década, o grupo de pesquisa tem estudado a miniaturização das colunas RAM-BSA cujas dimensões iniciais eram de 100 mm de comprimento por 4,6 mm de d.i.. Estas colunas foram bastante eficientes para a injeção direta de plasma^{155,156} e desde então a diminuição de seu comprimento (50

e 10 mm) e, seu emprego na injeção direta de outros fluidos biológicos tem sido investigados.^{68,69}

Inicialmente a coluna RAM-BSA *microbore* foi preparada nas mesmas condições estabelecidas e descritas para as colunas convencionais (capítulo 2). Entretanto, para que o preenchimento das tubulações de 2,1 mm com a fase estacionária requerida ocorresse de maneira homogênea, fez-se necessário o ajuste do tempo de eluição da fase móvel. Do mesmo modo, para o procedimento de imobilização da BSA *in situ* foram realizados ajustes na vazão da fase móvel e nos volumes dos reagentes eluídos. Sendo assim, a eficiência da exclusão proteica foi reavaliada seguindo o protocolo estabelecido no procedimento experimental. A FIGURA 3.2 ilustra o perfil de eluição das proteínas e, dos oligossacarídeos presentes no leite materno, o qual foi semelhante ao perfil apresentando pelas colunas de 4,6 mm (d.i.).

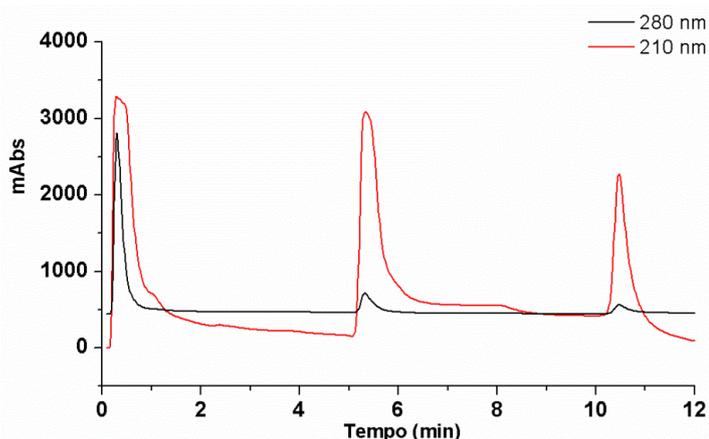


FIGURA 3. 2: Cromatogramas referentes ao perfil de exclusão das proteínas totais do leite materno em 280 nm e dos oligossacarídeos em 210 nm. Fase móvel: 0-4 min: água/isopropanol 95:5; 4-7 min: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM; pH 5,8) 70:30; 7-9 min: ACN/água/isopropanol 75:10:15; 9-12 min: água/isopropanol 95:5; vazão 400 μ L/min.

Os diferentes tempos de retenção observados para os oligossacarídeos devem estar relacionados às diferentes características físico-químicas, conforme descrito anteriormente na seção 1.2. Sendo assim, o tempo de transferência dos analitos deve ser otimizado, de maneira criteriosa e seletiva, com o intuito de minimizar possíveis efeitos de matriz.

As porcentagens de proteínas totais do leite materno excluídas pela coluna RAM-BSA em diferentes volumes de injeção são apresentadas na TABELA 3.3 e FIGURA 3.3.

TABELA 3. 3: Porcentagens de proteínas do leite materno excluídas da coluna RAM-BSA C₁₈, correspondentes à fração de 0 – 1 min..

Volume injetado (µL)	RAM-BSA C ₁₈	
	Media (%)	CV (%)
2,5	72,7	27
5,0	96,3	2,8
10	100	7,5

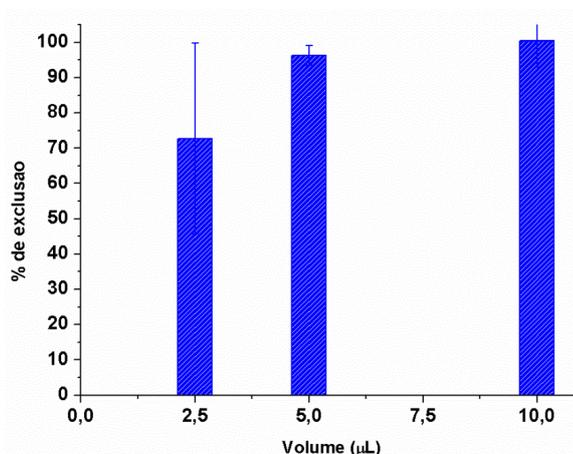


FIGURA 3. 3: Porcentagens de exclusão correspondentes às frações eluídas de 0 - 1 min

Embora o método de Bradford utilizado para a determinação do teor proteico tenha sido sensível aos pequenos volumes injetados, acredita-se que a baixa concentração proteica em virtude da diluição no menor volume de injeção (2,5 µL) seja responsável pelo alto coeficiente de variação.

Diante do uso extensivo das colunas comerciais para a injeção direta de matrizes biológicas,⁹ as colunas Oasis[®] HLB (20 x 2,1 mm) e LiChrospher[®] alquildiol C₁₈ (originalmente de 25 x 4,0 mm, porém desempacotada e reutilizada em um tubo de 50 x 2,1 mm) foram avaliadas em relação ao perfil de exclusão das proteínas e dos oligossacarídeos presentes no leite materno nas mesmas condições descritas para a RAM-BSA. (FIGURA 3.4)

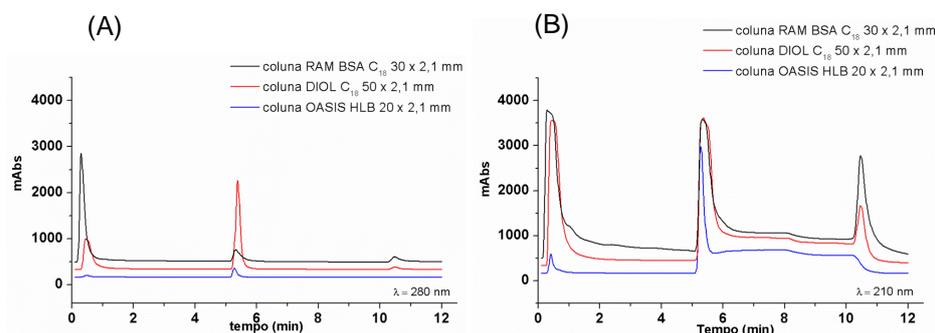


FIGURA 3. 4: Comparação da exclusão entre a coluna RAM-BSA e as colunas comerciais A) perfil das proteínas a 280 nm e B) perfil dos oligossacarídeos a 210 nm Fase móvel: 0-4 min: água/isopropanol 95:5; 4-7 min: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM; pH 5,8) 70:30; 7-9 min: ACN/água/isopropanol 75:10:15; 9-12 min: água/isopropanol 95:5; vazão 400 μ L/min.

Ao se analisar os cromatogramas obtidos para as três colunas avaliadas observa-se desempenho semelhante entre elas em relação às análises monitoradas a 210 nm. Entretanto em relação à exclusão proteica (280 nm) nestas condições a coluna RAM-BSA possui melhor desempenho que as demais, uma vez que as proteínas do leite materno são eluídas com até 2 min de análise e, portanto foi selecionada como coluna da primeira dimensão do sistema multidimensional.

Condições de ionização dos analitos

Devidos aos baixos níveis de concentração em que o método foi desenvolvido todas as etapas do desenvolvimento do método foram monitoradas através do MS. Sendo assim as condições de ionização e de fragmentação de FLU e NOR foram estabelecidas com a infusão direta dos analitos (100 ng/mL) no modo combinado, onde a fase móvel vinda do LC combina-se com a solução dos padrões vinda da bomba seringa antes da entrada da fonte de ionização. Nesta etapa percebeu-se a necessidade do uso de uma solução tampão ou da adição de ácido fórmico para melhorar a ionização de ambos analitos.

Baseado em dados da literatura para a análise de FLU e NOR por MS associados aos testes por infusão direta, foi definido como fase móvel solução tampão de acetato de amônio/ACN em proporções a serem avaliadas cromatograficamente. A tabela 3.4 mostra as condições estabelecidas para ionização e fragmentação de FLU e NOR no modo positivo.

TABELA 3. 4: Condições ideais de ionização e fragmentação obtidas para fluoxetina e norfluoxetina.

Parâmetros de ionização	Composto	Íon precursor (m/z) [M+H] ⁺	Transição SRM (m/z)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell (s)
Voltagem do capilar (kV)	FLU	310,1	44,0	12	10	0,2
Temperatura de dessolvatação (°C)		310,1	148,1	18	8	
Vazão do gás de dessolvatação (L/h)	NOR	296,1	29,9	12	6	0,2
Vazão do gás de colisão (mL/min)		296,1	134,1	12	6	

Configuração do sistema 2D LC-MS

O sistema 2D LC-MS utilizado neste trabalho foi especialmente configurado para a injeção direta de amostras biológicas e consiste no arranjo de 3 válvulas, sendo elas: 1 – válvula de injeção com caminho de 0,4 µm d.i. e suporta pressão de até 5000 psi; 2 – válvula comutadora com caminho de 0,2 mm d.i. e suporta pressão de até 15000 psi, utilizada para acoplar a válvula de injeção à coluna RAM-BSA e 3 – válvula comutadora com caminho de 0,2 µm d.i. e suporta pressão de até 15000 psi, utilizada para acoplar as colunas da primeira e segunda dimensão. Este sistema de válvulas está representado na FIGURA 3.5, e a TABELA 3.5 apresenta as posições das válvulas nas subseqüentes etapas: injeção, exclusão, transferência (acoplamento entre colunas) e análise.

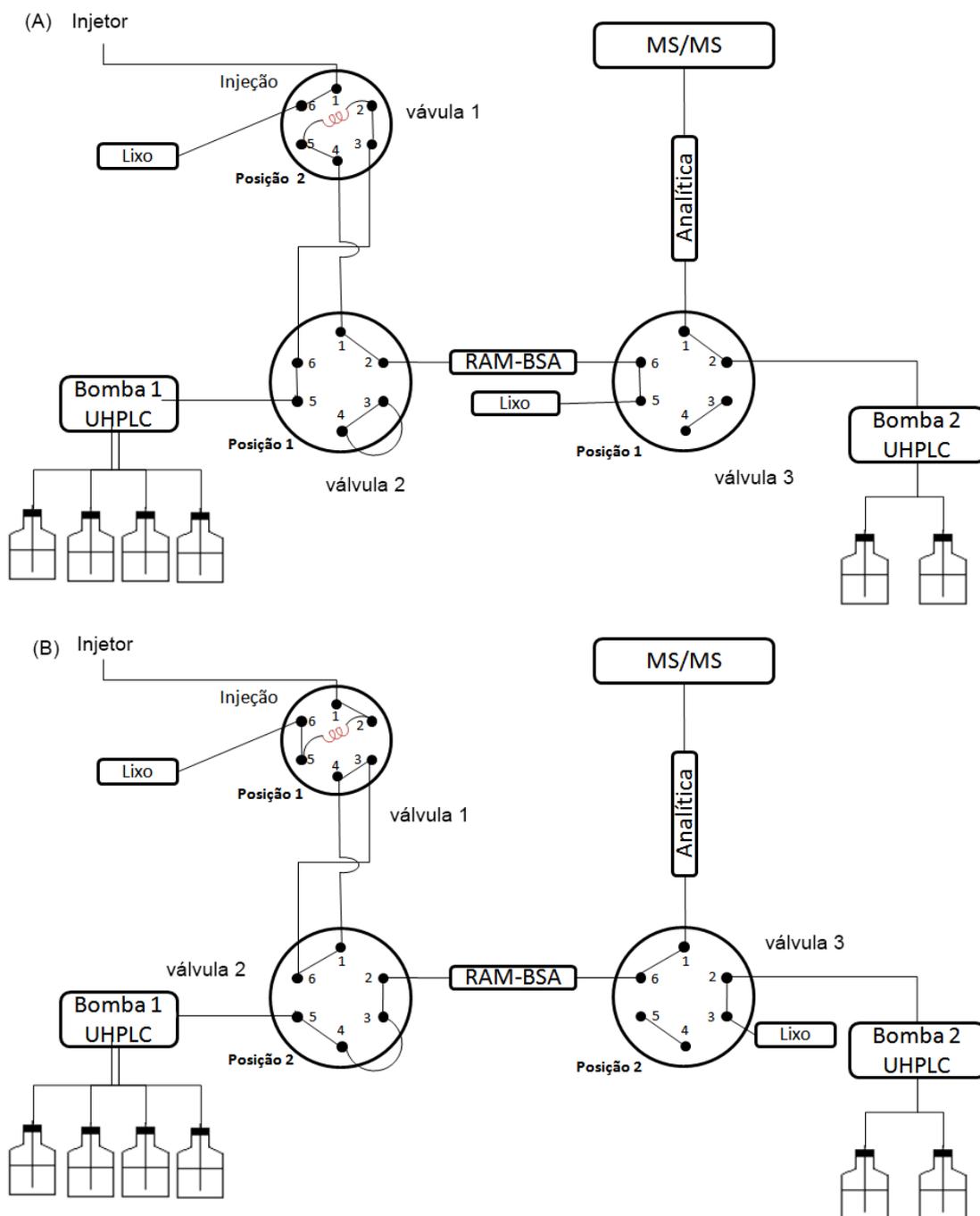


FIGURA 3. 5: Esquema de válvulas utilizado para as análises no sistema 2D LC-MS. (A) sistema desacoplado – etapa de exclusão e (B) sistema acoplado – etapa de transferência.

TABELA 3. 5: Posição das válvulas e suas respectivas funções durante a análise.

Válvula	Posição	Função
1	1	Carregamento do loop
	2	Injeção na coluna RAM-BSA
2	1	Exclusão proteica
	2	Eluição dos analitos da RAM-BSA
3	1	Condicionamento da coluna analítica
	2	Acoplamento entre as colunas

Condições de retenção, extração e transferência dos analitos, e acoplamento 2D

O estudo de retenção dos analitos em função do pH não foi realizado neste trabalho, mesmo se tratando do modo reverso de eluição pois, FLU e NOR têm pKas em torno de 9,5 e a faixa de pH permitida para uso nas colunas com suporte de sílica é de 3 a 8. A retenção dos compostos nas condições de exclusão das proteínas e a fase móvel de transferência foram avaliadas simultaneamente. Para isto, uma solução aquosa contendo uma mistura de 500 ng/mL dos padrões de FLU e NOR, foi injetada no sistema contendo apenas a coluna RAM-BSA nas condições apresentadas na TABELA 3.6.

TABELA 3. 6: Condições cromatográficas utilizadas no estudo de retenção dos analitos.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 4	água/isopropanol	95:5	Exclusão proteica
4 – 7	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	diferentes proporções	Eluição dos analitos
7 – 9	ACN/água/isopropanol	75:10:15	Limpeza da RAM-BSA
9 – 12	água/isopropanol	95:5	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 μ L e volume de injeção de 10 μ L.

Os resultados demonstram que ambos analitos ficam retidos na coluna RAM-BSA durante o tempo de exclusão proteica e nas 3 proporções de

ACN/tampão avaliadas os intervalos de transferência foram em torno de 48 segundos. (FIGURA 3.6)

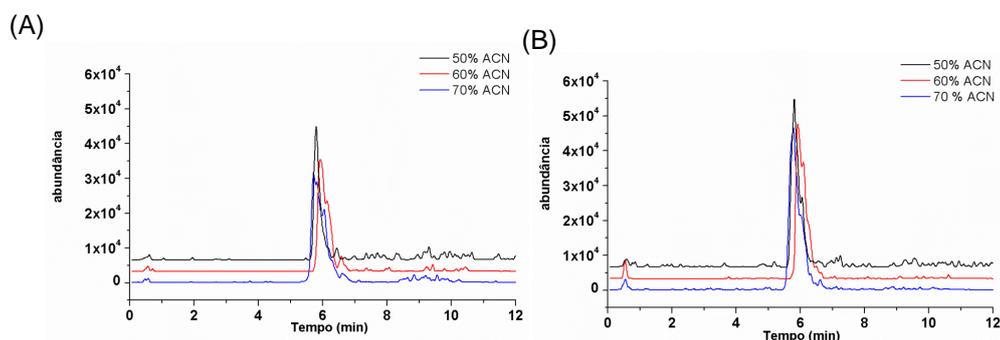


FIGURA 3. 6: Cromatogramas obtidos para a eluição de (A) FLU e (B) NOR nas diferentes proporções de fase móvel.

Diante destes resultados optou-se pela fase de transferência com 70% ACN e o acoplamento com a coluna analítica Acquity BEH C₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 μm) foi avaliado com a injeção de 10 μL de leite materno fortificado com os analitos (10 ng/mL) nas condições descritas para a coluna RAM-BSA na TABELA 3.7., com tempo de transferência dos analitos de 78 s (4,3 – 5,6 min) e coluna analítica com fase móvel isocrática ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 70:30 (v/v) e vazão de 400 μL/min

TABELA 3. 7: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento com a coluna Acquity BEH C₈.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v) bomba 1	Evento
0 – 3	água/isopropanol	95:5	Exclusão proteica
3 – 6	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	70:30	Eluição dos analitos
4,3 – 5,6	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	70:30	Acoplamento entre colunas
6 – 7,5	ACN/água/isopropanol	75:10:15	Limpeza da RAM-BSA
7,5 - 10	água/isopropanol	95:5	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 μL e volume de injeção de 10 μL.

*fase móvel bomba 2: isocrática ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 70:30 (v/v)

A FIGURA 3.7 mostra os cromatogramas de íons totais obtidos para FLU e NOR no acoplamento entre RAM-BSA C₁₈ e coluna analítica Acquity BEH C₈.

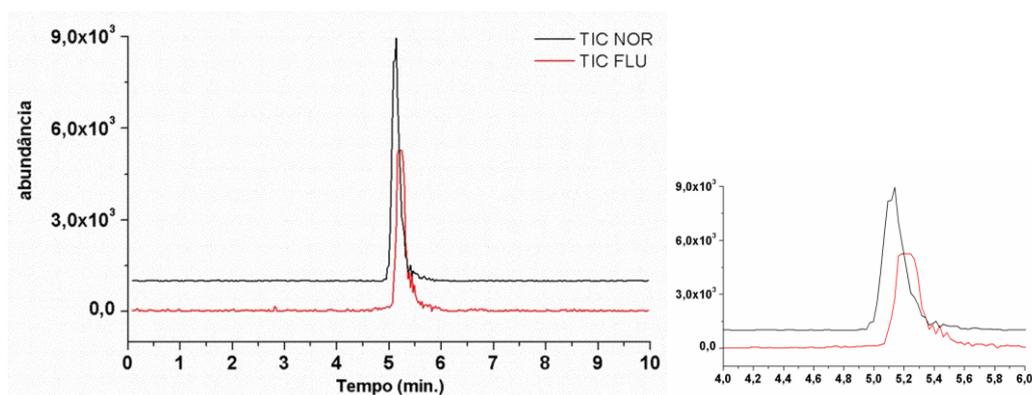


FIGURA 3. 7: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C₁₈ e coluna analítica Acquity BEH C₈.

O acoplamento com a coluna C₈ demonstrou baixa retenção dos analitos nestas condições. A eluição dos compostos na coluna da segunda dimensão antes que o acoplamento termine é nítida, e neste caso é muito provável que componentes da matriz coeluem e proporcionem um efeito de matriz bastante pronunciado. Além disso, durante o desenvolvimento do método notou-se o aumento da pressão no sistema à medida que as injeções foram realizadas, sugerindo a precipitação de algum componente do leite materno no topo da coluna ou nas tubulações do sistema. Na tentativa de evitar esta precipitação foi realizada eluição gradiente (3 - 4 min, 0 - 70% ACN) e mantendo-se as condições anteriores. Este procedimento amenizou o aumento da pressão no sistema, entretanto não houve influência significativa na seletividade do método e os analitos continuaram eluindo na coluna analítica durante o acoplamento de 108 s (4,5 – 6,3 min). (FIGURA 3.8)

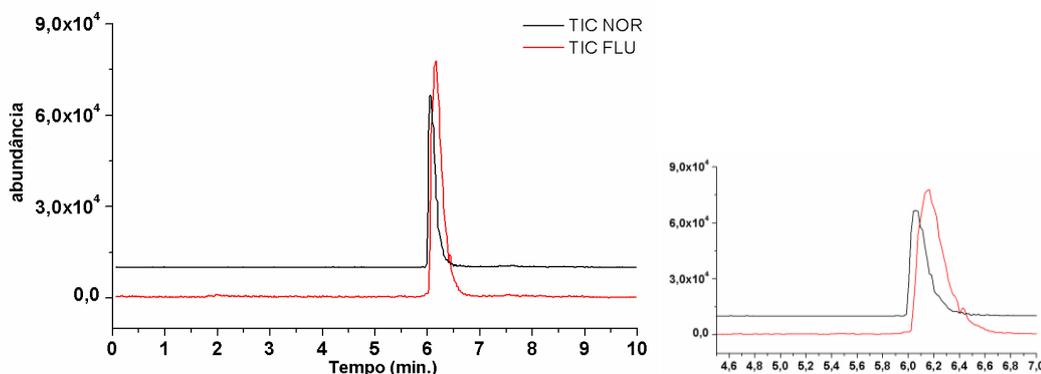


FIGURA 3. 8: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C₁₈ e coluna analítica Acquity BEH C₈.

Com o intuito de obter melhor retenção e separação de FLU e NOR o acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m) foi avaliado com a injeção de 10 μ L de leite materno fortificado com os analitos (10 ng/mL) nas condições da TABELA 3.8, com tempo de transferência dos analitos de 36 s (5,5 – 6,1 min) e coluna analítica com fase móvel isocrática ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 70:30 (v/v) e vazão de 400 μ L/min.

TABELA 3. 8: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v) bomba 1	Evento
0 – 3	água/isopropanol	95:5	Exclusão proteica
3 – 4	Gradiente linear de ACN	0 – 70%	Eluição dos analitos
4 – 6,5	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	70:30	Eluição dos analitos
5,5 – 6,1	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	70:30	Acoplamento entre colunas
6,5 – 8,5	ACN/água/isopropanol	75:10:15	Limpeza da RAM-BSA
8,5 - 12	água/isopropanol	95:5	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 μ L e volume de injeção de 10 μ L.

* Fase móvel bomba 2: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 70:30 (v/v)

Os resultados mostraram que o desempenho da coluna fenil na retenção e separação entre endógenos e analitos foi excelente. (FIGURA 3.9) Desta forma esta coluna foi selecionada para o desenvolvimento e validação do método, e no momento em que a avaliação da seletividade, efeito de matriz, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e linearidade foi iniciada a coluna começou a perder resolução, a pressão do sistema durante o acoplamento chegou ao limite máximo (15000 psi) e a coluna RAM-BSA começou a vazar. Mais uma vez as colunas foram limpas e avaliadas, o sistema cromatográfico foi limpo, pois houve precipitação de substâncias na tubulação e o método foi reiniciado. Entretanto os mesmos problemas voltaram a ocorrer.

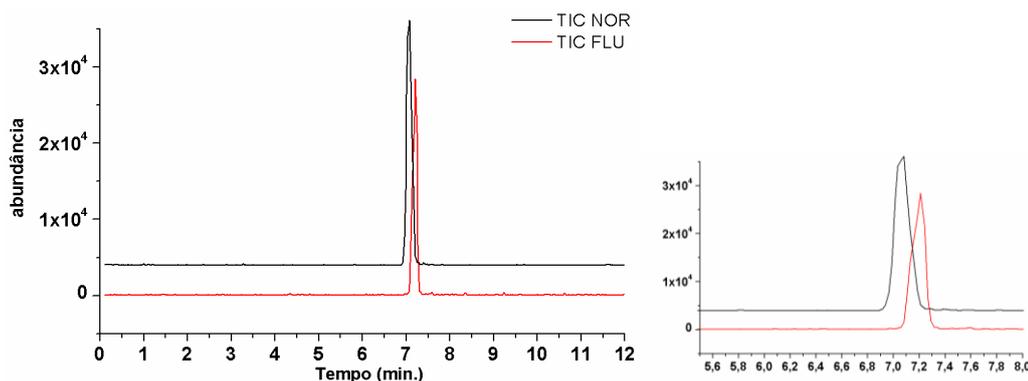


FIGURA 3. 9: Cromatogramas de íons totais obtido para o acoplamento entre RAM-BSA C₁₈ e coluna analítica Acquity BEH fenil.

Levando em consideração que as proteínas do leite materno são eluidas nos primeiros minutos de análise e que os oligossacarídeos estão presentes na matriz em maior proporção e alguns só eluem na presença de solvente orgânico, supôs-se que eles foram os responsáveis pelo aumento da pressão e o entupimento do sistema cromatográfico. Frente a este desafio várias estratégias foram investigadas, como, mudança de vazão durante o acoplamento, redução na % ACN durante transferência e troca de fase móvel de exclusão para tampão/MeOH 95:5 (v/v). Tais procedimentos não foram capazes de evitar o aumento de pressão e o entupimento, portanto decidiu-se trocar o solvente orgânico de transferência para MeOH com a finalidade de evitar a precipitação dos endógenos, considerando que estes sejam majoritariamente oligossacarídeos e bastante solúveis em MeOH.

Inicialmente o tempo de transferência dos analitos foi novamente avaliado injetando-se 10 µL de leite materno fortificado com 500 ng/mL de cada analito nas condições da TABELA 3.9

TABELA 3. 9: Condições cromatográficas utilizadas para verificar o tempo de transferência na coluna RAM-BSA, utilizando-se MeOH.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 3	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Exclusão proteica
3 – 4	Gradiente linear de MeOH	10 – 70%	Eluição dos analitos
4 – 11	MeOH/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	70:30	Eluição dos analitos
11 - 12	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 µL e volume de injeção de 10 µL.

De acordo com o cromatograma obtido a transferência dos analitos pode ser realizada sem a interferência dos oligossacarídeos, e sendo assim, o tempo de acoplamento foi definido em 4 – 6,5 min (150 s). (FIGURA 3.10)

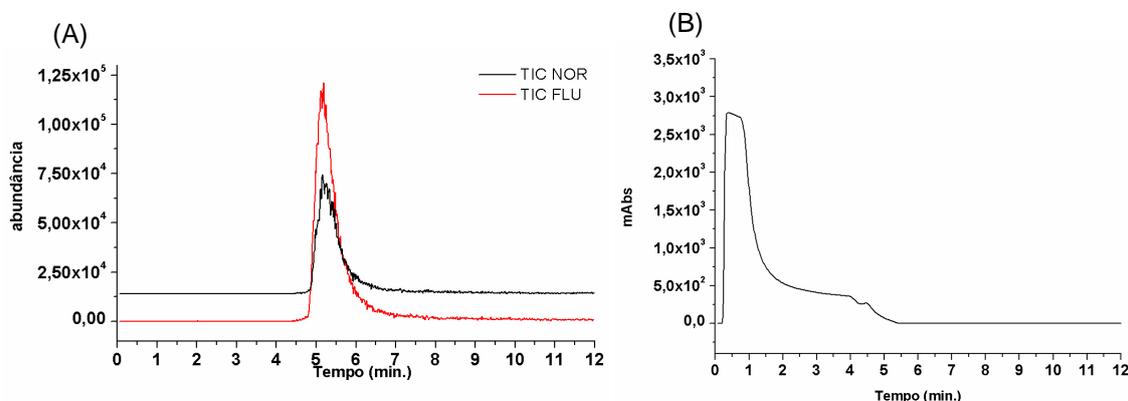


FIGURA 3. 10: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos na coluna RAM-BSA.

O acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil foi avaliado injetando-se 10 μ L leite materno fortificado com 140 ng/mL de cada analito nas mesmas condições descritas acima e com monitoramento simultâneo pelo UV-visível em 210 e 280 nm. O acoplamento nestas condições mostrou-se eficiente para a separação entre os compostos endógenos e os analitos, no entanto foram obtidas bandas alargadas devido à alta difusão dos analitos o que levou à redução da resolução e da sensibilidade do método, além disso, a alta pressão durante o acoplamento das colunas, devido à viscosidade do metanol, continuou sendo um fator limitante no desenvolvimento do método. (FIGURA 3.11)

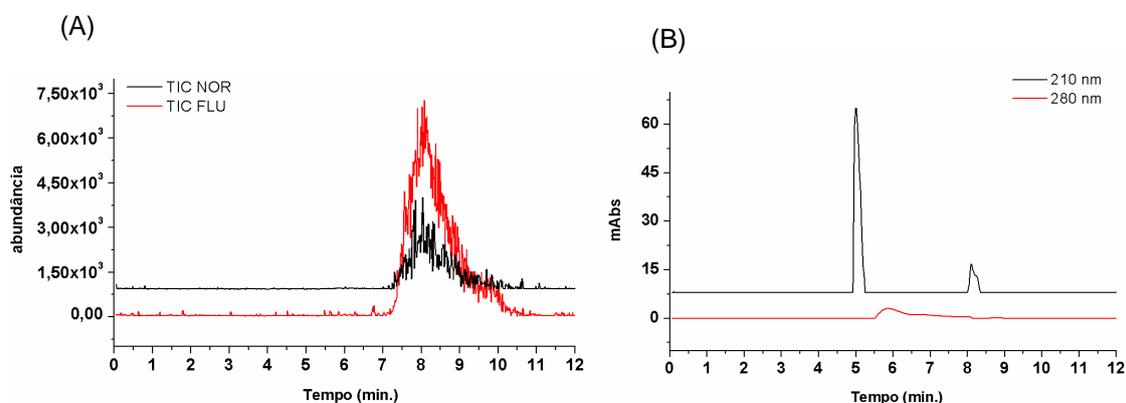


FIGURA 3. 11: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Acquity BEH fenil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) na coluna RAM-BSA.

Diante dos resultados obtidos, dois caminhos foram investigados: 1) troca da coluna analítica e 2) mistura entre solventes orgânicos para obtenção da sensibilidade e resolução apropriadas. De acordo com a teoria, a força da fase móvel no modo reverso de separação não depende apenas do percentual de solvente orgânico, mas também de sua natureza.. Cabe ressaltar que neste caso a força do solvente é inversamente proporcional à sua polaridade. Assim, para alcançar a eficiência cromatográfica desejada, o esquema de otimização da separação em fase reversa proposto por Snyder e Kirkland é comumente utilizado.¹³¹ Geralmente, este procedimento mantém constante a força da fase móvel e com o auxílio do normógrafo 3 solventes são misturados (por exemplo água, ACN e MeOH) em diferentes proporções até que a seletividade desejada seja obtida.¹³¹

Assim, diferentes proporções de tampão/ACN/MeOH foram testadas mantendo-se a força de 50% de ACN e a proporção mais adequada foi tampão/ACN/MeOH 40:25:35 (v/v/v). O tempo de transferência foi então determinado injetando-se 10 µL de leite materno fortificado com 200 ng/mL de cada analito nas condições descritas na TABELA 3.10 com vazão de 400 µL e monitoramento no UV-visível em 210 e 280 nm.

TABELA 3. 10: Condições cromatográficas otimizadas para o acoplamento com a coluna Acquity BEH fenil.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 2,5	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Exclusão proteica
2,5 – 6	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/ACN/MeOH	40:25:35	Eluição dos analitos
6 – 8,5	ACN/água/MeOH	70:15:15	Limpeza da RAM-BSA
8,5 – 10	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Condicionamento da RAM-BSA

Esta mudança de fase móvel proporcionou o afinamento das bandas cromatográficas e um tempo de acoplamento de apenas 36 s (4,5 – 5,1 min) foi obtido com excelente seletividade em relação aos compostos endógenos da matriz. (FIGURA 3.12)

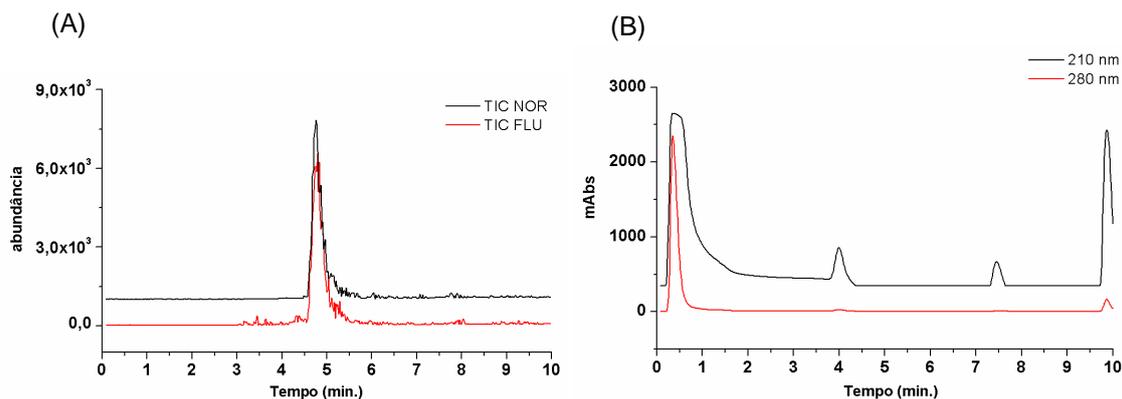


FIGURA 3. 12: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Acquity BEH fenil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) durante a análise.

As colunas do tipo *fused core*, preenchidas com partículas superficialmente porosas, tem sido considerada uma ótima alternativa para o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e seletivos.¹⁵⁷ A grande vantagem destas colunas é a capacidade de proporcionar eficiência similar às colunas com partículas sub- $2\mu\text{m}$, porém com pressão de volta muito menor. Sendo assim a coluna Ascentis Express fenil hexil (100 x 2,1 mm, $2,7\ \mu\text{m}$) foi selecionada para o estudo.

O acoplamento com a coluna Ascentis Express fenil hexil foi avaliado nas condições cromatográficas descritas na TABELA 3.11 para a coluna RAM-BSA C_{18} , ambas dimensões trabalharam com vazão de $400\ \mu\text{L}$, monitoramento no UV-visível em 210 e 280 nm e volume de injeção de $10\ \mu\text{L}$ de amostra de leite materno fortificado com $20\ \text{ng/mL}$ de cada analito. As condições da coluna analítica foram: fase móvel isocrática ACN/ tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 60:40 (v/v).

TABELA 3. 11: Condições cromatográficas utilizadas para o acoplamento com a coluna Ascentis Express fenil hexil.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v) bomba 1	Evento
0 – 2,5	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Exclusão proteica
2,5 – 6	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/ACN/MeOH	40:25:35	Eluição dos analitos
4,3 – 5,3	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/ACN/MeOH	40:25:35	Acoplamento entre as colunas
6 – 9	ACN/água/MeOH	70:15:15	Limpeza da RAM-BSA
9 – 12	tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)/MeOH	90:10	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 μ L e volume de injeção de 10 μ L.

* Fase móvel bomba 2: ACN/ tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 60:40 (v/v)

Os resultados apresentados na FIGURA 3.13 demonstram que o acoplamento com a coluna *fused core* nas condições descritas acima conferiu ao método ótima sensibilidade, devido à baixa difusão dos compostos, com baixa pressão durante o acoplamento entre as colunas. A mistura de solventes da fase móvel de transferência impediu a precipitação dos componentes da matriz nas tubulações do sistema e o método desenvolvido foi validado nestas condições.

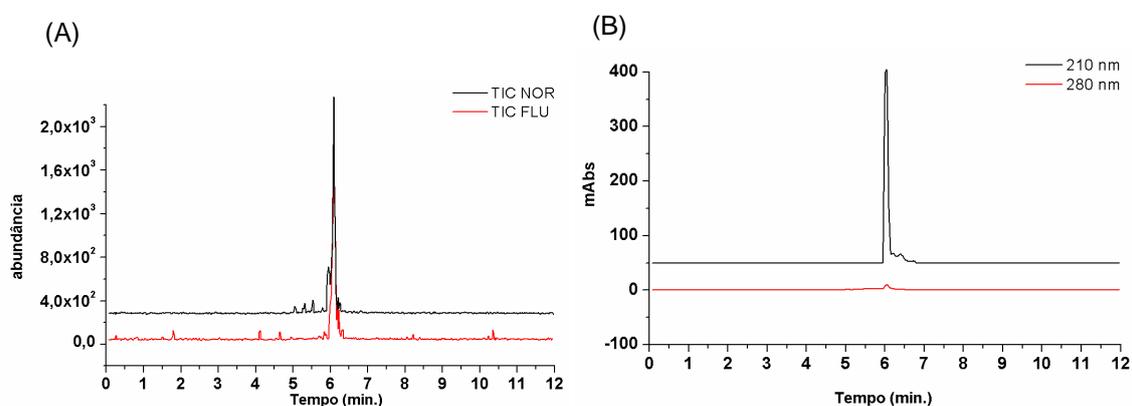


FIGURA 3. 13: (A) Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Ascentis Express fenil hexil e (B) cromatograma obtido para a eluição dos oligossacarídeos (210 nm) e proteínas (280 nm) durante a análise.

Com o intuito de melhorar a resposta dos analitos e garantir a total extração dos mesmos da matriz durante a etapa de centrifugação, foram testados a adição de isopropanol 40 μ L e 5 μ L de ácido fórmico após a etapa de equilíbrio (10 min de repouso) e antes da amostra ser centrifugada. Os experimentos mostraram que a simetria da banda e a sensibilidade foram melhoradas. (FIGURA 3.14)

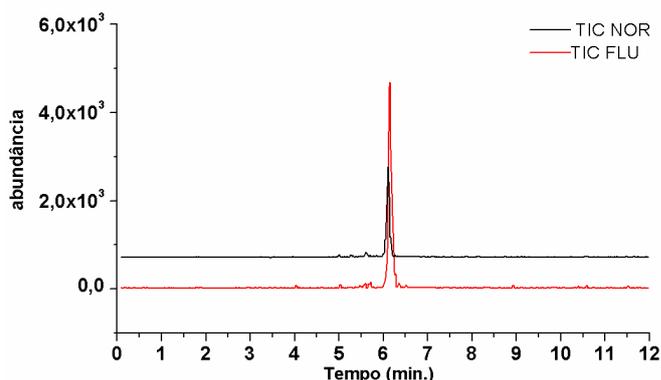


FIGURA 3. 14: Cromatograma de íons totais obtido para FLU e NOR no acoplamento entre coluna RAM-BSA e Ascentis Express fenil hexil após adição de isopropanol e ácido fórmico.

3.4.2 Validação do método

Com todas as condições estabelecidas o método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios internacionalmente aceitos,^{89,127} considerando-se a seletividade, o efeito de matriz, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de leite materno, livre dos analitos (leite branco), com análises da matriz biológica fortificada com os analitos. Os cromatogramas estão apresentados na FIGURA 3.15 e mostram que o método é seletivo, não apresentando interferentes coeluinto com os analitos de interesse no canal SRM selecionado.

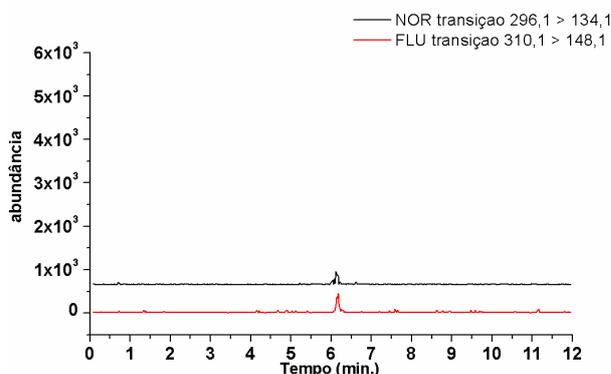


FIGURA 3. 15: Cromatograma de íons extraídos obtido para o leite materno branco.

Efeito de matriz

Como dito anteriormente, proteínas, lipídios e oligossacarídeos são componentes do leite materno que podem interferir tanto na extração dos analitos da matriz quanto na detecção dos mesmos. Além disso, existe o inconveniente da fonte de ionização sofrer um impacto negativo gerado pelo efeito de matriz. Devido à falta de protocolos estabelecidos para a eliminação ou redução deste problema, o efeito de matriz é sempre avaliado durante o desenvolvimento de métodos quantitativos que envolvem detecção por MS/MS.⁸⁸

Métodos para avaliar o efeito de matriz em sistemas com extração *on-line* não são preconizados pelos guias de validação. Apenas recentemente a *European Medicines Agency* preconizou que “... para o caso de preparo de amostras *on-line*, a variabilidade da resposta entre os lotes deve ser avaliado pela análise de 6 lotes de matriz fortificada nos níveis de concentração dos controles baixo e alto. O coeficiente de variação total deve ser $\leq 15\%$.”⁸⁹ Assim, neste estudo o efeito de matriz foi avaliado nos níveis de concentração das amostras de CQ baixo e CQ alto, fortificando-se amostras de leite materno branco coletadas de 8 indivíduos, sendo 4 mães de meninas e 4 mães de meninos, e calculando-se o CV entre as amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 3.12.

TABELA 3. 12: Coeficiente de variação obtido para o efeito de matriz entre diferentes indivíduos.

	Efeito de matriz FLU (%CV)		Efeito de matriz NOR (%CV)	
	CQ baixo	CQ alto	CQ baixo	CQ alto
Amostras totais (n=8)	15	16	16	13
Amostras de meninas (n=4)	10	11	16	5
Amostras de meninos (n=4)	5	8	11	9

Os resultados apresentados na tabela sugerem que as amostras com baixo nível de concentração sofrem maior influência da matriz. É válido ressaltar, entretanto, que os CVs obtidos refletem a variação da composição do leite materno em relação aos diferentes períodos de amamentação e às diferenças de sexo do bebê alimentado, por exemplo, meninos recebem leite com maior proporção de proteínas e gorduras do que meninas.^{106,158}

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através das curvas de calibração construídas para FLU e NOR. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear para ambos, com intercepto = 0 para FLU. As curvas de calibração e as respectivas equações estão representadas na FIGURA 3.16.

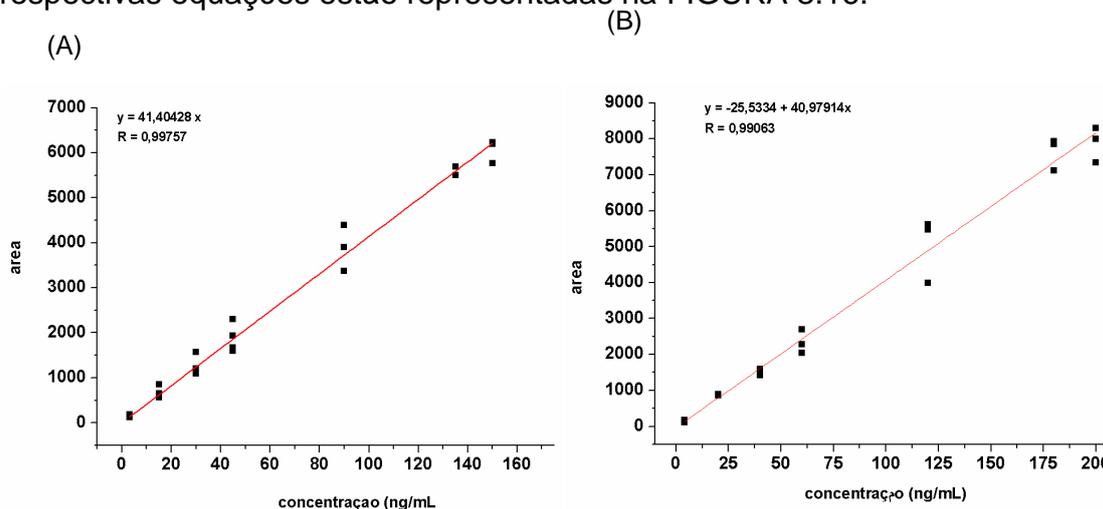


FIGURA 3. 16: Curvas analíticas obtidas para (A) FLU e (B) NOR.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98 e estão representados na TABELA 3.13 juntamente com os valores de LOD, LOQ e as respectivas equações das curvas geradas. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foi próxima a 15%, e a exatidão apresentou um desvio próximo de 15% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 15-20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos. ¹²⁷

TABELA 3. 13: Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método.

Analito	Faixa de concentração (ng/mL)	Equação da curva	R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
FLU	3 – 150	$Y = 41,40428X$	0,997	1	3
NOR	4 – 200	$Y = -25,5334 + 40,97914X$	0,990	2	4

As figuras de mérito avaliadas foram realizadas com amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, em três níveis de concentrações (baixo, médio e alto), em relação às concentrações da curva de calibração. Os LOQs foram as primeiras concentrações das curvas de calibração e os valores obtidos foram de 3,0 e 4,0 ng/mL para FLU e NOR, respectivamente. Os valores de LOD foram de 1,0 ng/mL para FLU e de 2,0 ng/mL para NOR. Estes valores são inferiores aos reportados na literatura para estes analitos em amostras de plasma.¹⁵⁹

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intra-lote e inter-lotes foram avaliadas analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade, em um mesmo lote e em lotes diferentes. Estes dados estão representados na TABELA 3.14, onde a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas.

TABELA 3. 14: Precisão, exatidão, média intra lotes (n=5), inter lotes (n=5) e eficiência do processo de extração (EP).

Composto (ng/mL)	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média (3 lotes)		EP (%)
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	
FLU									
6	104	15,4	120	11,1	100	12,4	108	12,9	68,9
60	92,8	12,1	119	5,83	97,4	3,69	103	7,21	60,2
120	99,9	16,0	120	7,94	94,0	8,30	105	10,7	61,3
NOR									
8	94,4	16,8	115	10,4	89,1	14,8	99,5	14,0	88,1
80	94,9	10,7	120	8,40	100	6,73	104	8,61	69,5
160	99,3	14,1	120	7,87	97,5	4,06	105	8,68	71,9

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação entre 3,69 e 16,8 considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 89,1 e 120% das concentrações nominais. Portanto, os valores estão dentro dos critérios de aceitação para validação de métodos bioanalíticos, considerando especialmente que o preparo da amostra inclui uma etapa de *standby* permitindo que o estado estacionário entre analitos e matriz seja alcançado.

Os dados da eficiência de extração também estão apresentados na TABELA 3.13 e compreendem uma faixa de 60,2 – 88,1%, para ambos analitos. Estes resultados foram determinados através da razão entre as áreas das amostras preparadas em leite materno (n=5) e as áreas das amostras preparadas em água (n=5), nos três níveis de CQ. Estes resultados demonstraram uma pequena influência na extração das concentrações mais baixas que pode estar relacionado à etapa de *standby* ou ao efeito de matriz. A estabilidade das amostras fortificadas foi avaliada por 5 ciclos de degelo e se mostraram estáveis por 60 dias.

Aplicação do método

A aplicação do método foi demonstrada a partir da análise de uma amostra de leite materno obtido de uma doadora em tratamento de depressão pós-parto. A amostra foi coletada 4 h após administração oral de 40 mg de fluoxetina. Após o procedimento de preparo da amostra, FLU e NOR foram quantificadas em 98,2 ng/mL e 56,3 ng/mL. A FIGURA 3.17 apresenta o cromatograma de íons extraídos obtidos para FLU e seu metabólito majoritário.

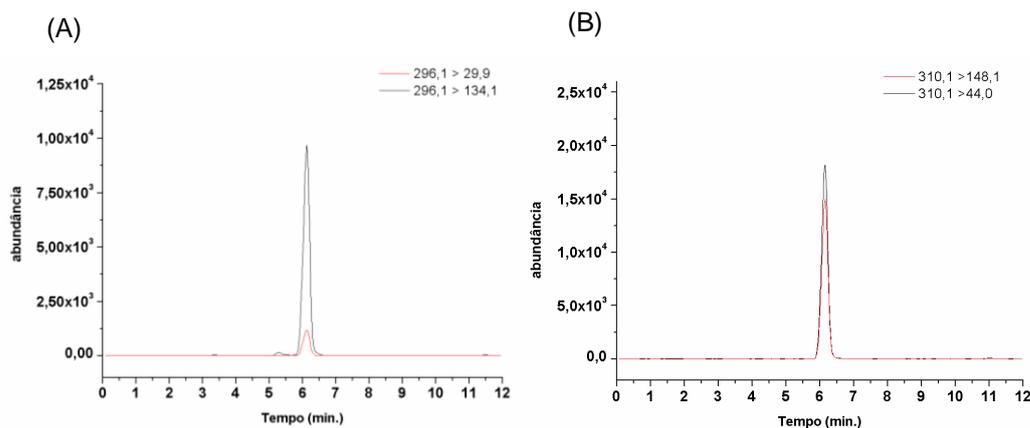


FIGURA 3. 17: Cromatogramas dos íons extraídos obtidos para a amostra de uma doadora em tratamento com fluoxetina, A) norfluoxetina e B) fluoxetina.

Os valores encontrados estão dentro da faixa de concentração reportada por outros trabalhos onde alguns efeitos colaterais, como diarreia, sonolência e irritabilidade foram relatados.^{140,149,160}

3.5 Conclusões

O presente trabalho reportou o desenvolvimento, validação e a aplicação de um método 2D LC-MS/MS para quantificação de fluoxetina e norfluoxetina em leite materno.

A coluna RAM-BSA C₁₈ preparada em escala *microbore* mostrou-se eficiente para a exclusão das proteínas e dos oligossacarídeos do leite materno e, seu desempenho foi mantido após 800 injeções (10 µL cada) de leite materno centrifugado.

O uso da RAM-BSA em escala *microbore* permitiu trabalhar em vazões adequadas para o acoplamento com o MS e com as colunas de partículas sub-2 µm e *fused core*. Seu emprego na primeira dimensão no sistema 2D para *clean up* das amostras, associado ao acoplamento com colunas de partículas sub-2 µm ou *fused core*, na segunda dimensão, proporcionou ao método alta sensibilidade e redução do efeito de matriz. Sendo assim, foram obtidos baixos limites de detecção e quantificação, com um tempo de análise de apenas 12 minutos. O método apresentou-se exato e preciso e, sua aplicação na quantificação do fármaco e seu

metabólito foi demonstrada, podendo ser empregado com sucesso em análises de rotina.

O desempenho das colunas sub-2 μm e *fused core* foi avaliado durante o desenvolvimento do método, no qual foi possível verificar que a coluna *fused core* apresenta eficiência cromatográfica similar às colunas sub-2 μm , sendo assim uma excelente alternativa no acoplamento 2D.

O acoplamento com a coluna de partículas sub-2 μm também foi investigado e apesar de ter se mostrado bastante promissor para a análise de fármacos em fluidos biológicos; esta configuração não pode ser utilizada para a validação do método devido a elevada pressão gerada no sistema durante o acoplamento das colunas.

Referências

Referências

1. FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PETROVIC, M.; PÉREZ, S. & BARCELÓ, D., "Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques". *Journal of Chromatography A*. **1259**: 86, 2012.
2. LI, L.; TIAN, D.; CHEN, F.; YANG, J.; YU, K. & SUN, Y., "Strategies for improving the quantitative bioanalytical performance of LC-MS in pharmacokinetic studies". *Current Drug Metabolism*. **13**(9): 1206, 2012.
3. YOUDIM, K.A. & SAUNDERS, K.C., "A review of LC-MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(17-18): 1326, 2010.
4. HEUDI, O., "Green bioanalytical methods are now a reality". *Bioanalysis*. **4**(11): 1257, 2012.
5. HEUDI, O., "High-throughput quantitative analysis of pharmaceutical compounds in biological matrices". *Bioanalysis*. **3**(8): 819, 2011.
6. MALDANER, L.; COLLINS, C.H. & JARDIM, I.C.S.F., "Modern stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography". *Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*. **33**(7): 1559, 2010.
7. NIESSEN, W.M.A., "Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening". *Journal of Chromatography A*. **1000**(1-2): 413, 2003.
8. NIESSEN, W.M.A., "State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **856**(1-2): 179, 1999.
9. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Direct bioanalytical sample injection with 2DLC-MS". *Bioanalysis*. **4**(22) 2012.
10. KATAOKA, H. & SAITO, K., "Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis". *Bioanalysis*. **4**(7): 809, 2012.

11. GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.L., "Recent developments in liquid chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance". *Journal of Chromatography A*. **1149**(1): 20, 2007.
12. CUNLIFFE, J.M., "Fast chromatography in the regulated bioanalytical environment: Sub-2- μ m versus fused-core particles". *Bioanalysis*. **4**(8): 861, 2012.
13. MALDANER, L. & JARDIM, I.C.S.F., "The state of art of ultra performance liquid chromatography". *O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência*. **32**(1): 214, 2009.
14. NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C.P.B. & LUCCI, P., "New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis". *Journal of Chromatography A*. **1228**: 298, 2012.
15. WU, N. & CLAUSEN, A.M., "Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations". *Journal of Separation Science*. **30**(8): 1167, 2007.
16. SALISBURY, J.J., "Fused-core particles: A practical alternative to sub-2 micron particles". *Journal of Chromatographic Science*. **46**(10): 883, 2008.
17. GAMA, M.R.; DA COSTA SILVA, R.G.; COLLINS, C.H. & BOTTOLI, C.B.G., "Hydrophilic interaction chromatography". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. **37**: 48, 2012.
18. BUSZEWSKI, B. & NOGA, S., "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **402**(1): 231, 2012.
19. FRANÇOIS, I.; SANDRA, K. & SANDRA, P., "Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations-A review". *Analytica Chimica Acta*. **641**(1-2): 14, 2009.
20. DIXON, S.P.; PITFIELD, I.D. & PERRETT, D., "Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: A review". *Biomedical Chromatography*. **20**(6-7): 508, 2006.
21. DAVID, F.; VANHOENACKER, G.; TIENPONT, B.; FRANÇOIS, I. & SANDRA, P., "Coupling columns and multidimensional configurations: To increase peak capacity in liquid chromatography". *LC-GC Europe*. **20**(3): 154, 2007.

22. HOLČAPEK, M.; JIRÁSKO, R. & LÍSA, M., "Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques". *Journal of Chromatography A*. **1259**: 3, 2012.
23. FENN, J.B., "Mass spectrometric implications of high-pressure ion sources". *International Journal of Mass Spectrometry*. **200**(1-3): 459, 2000.
24. CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H. & JARDIM, I.C.S.F., "The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food". *O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos*. **31**(3): 623, 2008.
25. KEBARLE, P. & PESCHKE, M., "On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions". *Analytica Chimica Acta*. **406**(1): 11, 2000.
26. SCHUHMACHER, R.; SULYOK, M. & KRŠKA, R., "Recent developments in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of organic residues and contaminants". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **390**(1): 253, 2008.
27. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MORAES, M.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications". *Bioanalysis*. **1**(3): 577, 2009.
28. GUO, X. & LANKMAYR, E., "Multidimensional approaches in LC and MS for phospholipid bioanalysis". *Bioanalysis*. **2**(6): 1109, 2010.
29. ZHANG, X.; FANG, A.; RILEY, C.P.; WANG, M.; REGNIER, F.E. & BUCK, C., "Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics-A review". *Analytica Chimica Acta*. **664**(2): 101, 2010.
30. LIANG, Y.; WANG, G.; XIE, L. & SHENG, L., "Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and emerging technologies for metabolite identification". *Current Drug Metabolism*. **12**(4): 329, 2011.
31. DE LIMA, V.V.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media chromatographic columns protein-immobilized and their evaluation for the analysis of drugs by direct injection of human plasma". *Quimica Nova*. **29**(1): 72, 2006.

32. MULLETT, W.M., "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**(2): 263, 2007.
33. KATAOKA, H., "Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **396**(1): 339, 2010.
34. KATAOKA, H. & SAITO, K., "Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(5): 926, 2011.
35. SAITO, K.; YAGI, K.; ISHIZAKI, A. & KATAOKA, H., "Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **52**(5): 727, 2010.
36. KATAOKA, H.; INOUE, R.; YAGI, K. & SAITO, K., "Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **49**(1): 108, 2009.
37. KUMAZAWA, T.; SAEKI, K.; YANAGISAWA, I.; UCHIGASAKI, S.; HASEGAWA, C.; SENO, H.; SUZUKI, O. & SATO, K., "Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **394**(4): 1161, 2009.
38. QUEIROZ, M.E.C.; OLIVEIRA, E.B.; BRETON, F. & PAWLISZYN, J., "Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples". *Journal of Chromatography A*. **1174**(1-2): 72, 2007.
39. ZHENG, M.M.; WANG, S.T.; HU, W.K. & FENG, Y.Q., "In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma". *Journal of Chromatography A*. **1217**(48): 7493, 2010.
40. ZHENG, M.M.; RUAN, G.D. & FENG, Y.Q., "Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone

- antibacterials in edible animal food". *Journal of Chromatography A*. **1216**(44): 7510, 2009.
41. YASUHARA, R.; EHARA, K.; SAITO, K. & KATAOKA, H., "Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytical Methods*. **4**(11): 3625, 2012.
42. RUDEWICZ, P.J., "Turbulent flow bioanalysis in drug metabolism and pharmacokinetics". *Bioanalysis*. **3**(14): 1663, 2011.
43. HE, X. & KOZAK, M., "Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephrines with ion-pairing turbulent flow online extraction". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **402**(9): 3003, 2012.
44. PEREZ, F.; LLORCA, M.; FARRÉ, M. & BARCELÓ, D., "Automated analysis of perfluorinated compounds in human hair and urine samples by turbulent flow chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **402**(7): 2369, 2012.
45. MUELLER, D.M.; DURETZ, B.; ESPOURTEILLE, F.A. & RENTSCH, K.M., "Development of a fully automated toxicological LC-MS n screening system in urine using online extraction with turbulent flow chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **400**(1): 89, 2011.
46. SCHEBB, N.H.; INCEOGLU, B.; ROSE, T.; WAGNER, K. & HAMMOCK, B.D., "Development of an ultra fast online-solid phase extraction (SPE) liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) based approach for the determination of drugs in pharmacokinetic studies". *Analytical Methods*. **3**(2): 420, 2011.
47. HARLAN, R.; CLARKE, W.; DI BUSSOLO, J.M.; KOZAK, M.; STRASESKI, J. & MEANY, D.L., "An automated turbulent flow liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (LC-IDMS) method for quantitation of serum creatinine". *Clinica Chimica Acta*. **411**(21-22): 1728, 2010.
48. BUNCH, D.R.; HEIDELOFF, C.; RITCHIE, J.C. & WANG, S., "A fast and simple assay for busulfan in serum or plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent flow online extraction technology". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(31): 3255, 2010.

49. MUELLER, D.M. & RENTSCH, K.M., "Sensitive quantification of sirolimus and everolimus by LC-MS/MS with online sample cleanup". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(13-14): 1007, 2010.
50. XIN, G.Z.; ZHOU, J.L.; QI, L.W.; LI, C.Y.; LIU, P.; LI, H.J.; WEN, X.D. & LI, P., "Turbulent-flow chromatography coupled on-line to fast high-performance liquid chromatography and mass spectrometry for simultaneous determination of verticine, verticinone and isovericine in rat plasma". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(3-4): 435, 2010.
51. STOLKER, A.A.M.; PETERS, R.J.B.; ZUIDERENT, R.; DIBUSSOLO, J.M. & MARTINS, C.P.B., "Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(7): 2841, 2010.
52. BREAUD, A.R.; HARLAN, R.; DI BUSSOLO, J.M.; MCMILLIN, G.A. & CLARKE, W., "A rapid and fully-automated method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using turbulent-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **411**(11-12): 825, 2010.
53. KREBBER, R.; HOFFEND, F.J. & RUTTMANN, F., "Simple and rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in edible tissues by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC-MS/MS)". *Analytica Chimica Acta*. **637**(1-2): 208, 2009.
54. BAI, F.; FRAGA, C.H.; TAGEN, M.; SCHAIQUEVICH, P.; HAGEDORN, N. & STEWART, C.F., "Simultaneous determination of cyclophosphamide and carboxyethylphosphoramidate mustard in human plasma using online extraction and electrospray tandem mass spectrometry (HTLC-ESI-MS/MS)". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **877**(18-19): 1709, 2009.
55. XU, Y.; WILLSON, K.J.; ANDERSON, M.D.G.; MUSSON, D.G.; MILLER-STEIN, C.M. & WOOLF, E.J., "Elimination of diastereomer interference to determine Telcagepant (MK-0974) in human plasma using on-line turbulent-flow technology and off-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography/tandem mass

- spectrometry". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **877**(16-17): 1634, 2009.
56. ZENG, W.; MUSSON, D.G.; FISHER, A.L.; CHEN, L.; SCHWARTZ, M.S.; WOOLF, E.J. & WANG, A.Q., "Determination of sitagliptin in human urine and hemodialysate using turbulent flow online extraction and tandem mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(3): 534, 2008.
57. PINKERTON, T.C., "High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection". *Journal of Chromatography*. **544**(1-2): 13, 1991.
58. HAGESTAM, H. & PINTERTON, T., "Production of "internal surface reversedphase" supports: the hydrolysis of selected substrates from silica using chymotrypsin". *Journal of Chromatography*. **368**: 77 1986.
59. GISCH, D.J.; HUNTER, B.T. & FEIBUSH, B., "Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*. **433**: 264, 1988.
60. HAGINAKA, J. & WAKAI, J., "Synthesis of a mixed-functional silica support for direct injection analysis of drugs in serum by liquid chromatography". *Chromatographia*. **29**(5-6): 223, 1990.
61. BOOS, K.S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D. & EISENBEIß, F., "Alkyl-Diol Silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **352**(7-8): 684, 1995.
62. DESILETS, C.P.; ROUNDS, M.A. & REGNIER, F.E., "Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography*. **544**(1-2): 25, 1991.
63. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N. & IMAI, H., "Some Characteristics of a Protein-Coated ODS Column and Its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection Analysis of Plasma Samples". *Chromatographia*. **19**: 466 1984.
64. CASSIANO, N.M.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media supports and their application to the direct

- analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384**(7-8): 1462, 2006.
65. MENEZES, M.L. & FÉLIX, G., "On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk". *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **21**(18): 2863, 1998.
66. FÉLIX, G. & CAMPÈSE, D., "Development of a new RAM-chiral column for determination of chiral drugs in biological fluids by HPLC". *Chromatographia*. **66**(3-4): 159, 2007.
67. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI JR, J. & CASS, Q.B., "Two-dimensional chromatography method applied to the enantiomeric determination of lansoprazole in human plasma by direct sample injection". *Chirality*. **22**(1): 35, 2010.
68. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
69. CASS, Q.B. & FERREIRA GALATTI, T., "A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (\pm)-modafinilic acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral-chiral chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(5): 937, 2008.
70. MOURA, F.; DE ALMEIDA, F.G.; REBELO LOPES, B. & BEZERRA CASS, Q., "Quantification of ampicillin in bovine milk by coupled-column ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Separation Science*. **35**(19): 2615, 2012.
71. ANDRADE, L.S.; DE MORAES, M.C.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & CASS, Q.B., "A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk". *Analytica Chimica Acta*. **654**(2): 127, 2009.
72. DE PAULA, F.C.C.R.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 221, 2008.

73. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L. & CASS, Q.B., "Direct injection of native aqueous matrices by achiral-chiral chromatography ion trap mass spectrometry for simultaneous quantification of pantoprazole and lansoprazole enantiomers fractions". *Journal of Chromatography A*. **1218**(20): 2865, 2011.
74. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L.; MADUREIRA, T.V.; TIRITAN, M.E. & CASS, Q.B., "A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples". *Talanta*. **82**(1): 384, 2010.
75. SANTOS-NETO, A.J.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F.M. & SJÖBERG, P.J.R., "Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 514, 2008.
76. ZHOU, X.; YE, X. & CALAFAT, A.M., "Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for the quantification of triclocarban and its oxidative metabolites in human urine and serum". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **881-882**: 27, 2012.
77. INOUE, K.; IKEMURA, A.; TSURUTA, Y.; TSUTSUMIUCHI, K.; HINO, T. & OKA, H., "On-line solid-phase extraction LC-MS/MS for the determination of Ac-SDKP peptide in human plasma from hemodialysis patients". *Biomedical Chromatography*. **26**(2): 137, 2012.
78. RODRIGUEZ-GONZALO, E.; GARCIA-GOMEZ, D. & CARABIAS-MARTINEZ, R., "Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1217**(1): 40, 2010.
79. YE, X.; ZHOU, X.; NEEDHAM, L.L. & CALAFAT, A.M., "In-vitro oxidation of bisphenol A: Is bisphenol A catechol a suitable biomarker for human exposure to bisphenol A?". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **399**(3): 1071, 2011.
80. RESKA, M.; OCHSMANN, E.; KRAUS, T. & SCHETTGEN, T., "Accurate quantification of mercapturic acids of styrene (PHEMAs) in human urine with direct sample injection using automated column-switching high-performance liquid

- chromatography coupled with tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(8): 3563, 2010.
81. RAO, R.N.; KUMAR, K.N. & SHINDE, D.D., "Determination of rat plasma levels of sertraline enantiomers using direct injection with achiral-chiral column switching by LC-ESI/MS/MS". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **52**(3): 398, 2010.
82. RAO, R.N.; VALI, R.M. & SHINDE, D.D., "On-line 2D-LC-ESI/MS/MS determination of rifaximin in rat serum". *Biomedical Chromatography*. **23**(11): 1145, 2009.
83. RAO, R.N. & SHINDE, D.D., "Two-dimensional LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in rat serum and urine". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **50**(5): 994, 2009.
84. YE, X.; TAO, L.J.; NEEDHAM, L.L. & CALAFAT, A.M., "Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum". *Talanta*. **76**(4): 865, 2008.
85. FRIEDRICH, G.; ROSE, T.; WAWKUSCHEWSKI, A.; KAFERT-KASTING, S.; LAUBE, B.; ARSENIIEV, L. & RISSLER, K., "Determination of testosterone metabolites in rat hepatocytes with and without cryopreservation by on-line SPE column-switching LC and MS detection". *Chromatographia*. **67**(1-2): 31, 2008.
86. LIU, M.; YAN, W.; LIN, J.-M.; HASHI, Y.; LIU, L.-B. & WEI, Y., "On-line liquid chromatography-mass spectrometry with dilution line to achieve large volume urine injection for the improvement of sensitivity". *Journal of Chromatography A*. **1198**: 87, 2008.
87. YE, X.; BISHOP, A.M.; NEEDHAM, L.L. & CALAFAT, A.M., "Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk". *Analytica Chimica Acta*. **622**(1-2): 150, 2008.
88. TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. & CAPPIELLO, A., "An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*. **30**(3): 491, 2011.
89. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*, 2011

90. AHMAD, S.; KALRA, H.; GUPTA, A.; RAUT, B.; HUSSAIN, A. & RAHMAN, M.A., "HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis". *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. **4**(4): 267, 2012.
91. GUO, X. & LANKMAYR, E., "Phospholipid-based matrix effects in LC-MS bioanalysis". *Bioanalysis*. **3**(4): 349, 2011.
92. KRAMER, M.S., ""Breast is best": The evidence". *Early Human Development*. **86**(11): 729, 2010.
93. CHAVES, R.G.; LAMOUNIER, J.A. & CÉSAR, C.C., "Association between duration of breastfeeding and drug therapy". *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **1**(3): 216, 2011.
94. CHAVES, R.G.; LAMOUNIER, J.A. & CÉSAR, C.C., "Self-medication in nursing mothers and its influence on the duration of breastfeeding". *Automedicação em nutrizes e sua influência sobre a duração do aleitamento materno*. **85**(2): 129, 2009.
95. WARD, R.M.; BATES, B.A.; BENITZ, W.E.; BURCHFIELD, D.J.; RING, J.C.; WALLS, R.P. & WALSON, P.D., "The transfer of drugs and other chemicals into human milk". *Pediatrics*. **108**(3): 776, 2001.
96. HALE, T.W., "Maternal medications during breastfeeding". *Clinical Obstetrics and Gynecology*. **47**(3): 696, 2004.
97. KENDALL-TACKETT, K. & HALE, T.W., "Review: The use of antidepressants in pregnant and breastfeeding women: A review of recent studies". *Journal of Human Lactation*. **26**(2): 187, 2010.
98. BREITZKA, R.L.; SANDRITTER, T.L. & HATZOPOULOS, F.K., "Principles of Drug Transfer into Breast Milk and Drug Disposition in the Nursing Infant". *Journal of Human Lactation*. **13**(2): 155, 1997.
99. CHAVES, R.L., JA, "Uso de medicamentos durante a lactação". *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)*. **80**(5) 2004.
100. FLEISHAKER, J.C., "Models and methods for predicting drug transfer into human milk". *Advanced Drug Delivery Reviews*. **55**(5): 643, 2003.
101. ROWE, H.; BAKER, T. & HALE, T.W., "Maternal Medication, Drug Use, and Breastfeeding". *Pediatric Clinics of North America*. **60**(1): 275, 2013.

102. RIBEIRO, L.D., MU; GARCIA, JN; HADLER, MCCM; YAMASHITA, C; SIGULEM, DM, "Nutrição e Alimentação na Lactação". *COMPACTA NUTRIÇÃO*, 2002.
103. NINONUEVO, M.R. & LEBRILLA, C.B., "Mass spectrometric methods for analysis of oligosaccharides in human milk". *Nutrition Reviews*. **67**(SUPPL. 2): S216, 2009.
104. RUHAAK, L.R. & LEBRILLA, C.B., "Analysis and role of oligosaccharides in milk". *BMB Reports*. **45**(8): 442, 2012.
105. COPPA, G.V.; PIERANI, P.; ZAMPINI, L.; CARLONI, I.; CARLUCCI, A. & GABRIELLI, O., "Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation". *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*. **88**(430): 89, 1999.
106. PETHERICK, A., "Development: Mother's milk: A rich opportunity". *Nature*. **468**(7327 SUPPL.): S5, 2010.
107. FRÍGULS, B.; JOYA, X.; GARCÍA-ALGAR, O.; PALLÁS, C.R.; VALL, O. & PICHINI, S., "A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(3): 1157, 2010.
108. MARCHEI, E.; ESCUDER, D.; PALLAS, C.R.; GARCIA-ALGAR, O.; GÓMEZ, A.; FRIGULS, B.; PELLEGRINI, M. & PICHINI, S., "Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **55**(2): 309, 2011.
109. ITO, S. & LEE, A., "Drug excretion into breast milk—Overview". *Advanced Drug Delivery Reviews*. **55**: 617 2003.
110. FORTINGUERRA, F.; CLAVENNA, A. & BONATI, M., "Psychotropic Drug Use During Breastfeeding: A Review of the Evidence". *Pediatrics*. **124**(4): e547 2009.
111. LORENZATO, R.Z.; CAVALLI, R.D.C.; DUARTE, G.; SAKAMOTO, A.C.; FILHO, F.M.; NOGUEIRA, A.A. & CUNHA, S.P.D., "Epilepsy and Pregnancy: Evolution and Fetal Outcome". *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. **24**(8): 521 2002.
112. PENNELL, P.B.; GIDAL, B.E.; SABERS, A.; GORDON, J. & PERUCCA, E., "Pharmacology of antiepileptic drugs during pregnancy and lactation". *Epilepsy & Behavior*. **11**: 263 2007.

113. KLEIN, A., "The Postpartum Period in Women with Epilepsy". *Neurologic Clinics*. **30**(3): 867, 2012.
114. OH, E.K.; BAN, E.; WOO, J.S. & KIM, C.K., "Analysis of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in human plasma using high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **386**(6): 1931, 2006.
115. MIAO, X.-S. & METCALFE, C.D., "Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **75**(15): 3731, 2003.
116. BRETON, H.; COCIGLIO, M.; BRESSOLLE, F.; PEYRIERE, H.; BLAYAC, J.P. & HILLAIRES-BUYS, D., "Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **828**(1-2): 80, 2005.
117. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. & GILMAN, A.G., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10 th ed. 2001.
118. SHIMOYAMA, R.; OHKUBO, T. & SUGAWARA, K., "Monitoring of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in breast milk and plasma by high-performance liquid chromatography". *Annals of Clinical Biochemistry*. **37**(2): 210, 2000.
119. TOGUNDE, O.P.; OAKES, K.D.; SERVOS, M.R. & PAWLISZYN, J., "Determination of pharmaceutical residues in fish bile by solid-phase microextraction couple with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)". *Environmental Science and Technology*. **46**(10): 5302, 2012.
120. TOGUNDE, O.P.; LORD, H.; OAKES, K.D.; SERVOS, M.R. & PAWLISZYN, J., "Development and evaluation of a new in vivo solid-phase microextraction sampler". *Journal of Separation Science*. **36**(1): 219, 2013.
121. SUBRAMANIAN, M.; BIRNBAUM, A.K. & REMMEL, R.P., "High-speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography-mass spectrometry". *Therapeutic Drug Monitoring*. **30**(3): 347, 2008.
122. VUCKOVIC, D.; DE LANNOY, I.; GIEN, B.; YANG, Y.; MUSTEATA, F.M.; SHIREY, R.; SIDISKY, L. & PAWLISZYN, J., "In vivo solid-phase microextraction for single rodent pharmacokinetics studies of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice". *Journal of Chromatography A*. **1218**(21): 3367, 2011.

123. LIONETTO, L.; CASOLLA, B.; CAVALLARI, M.; TISEI, P.; BUTTINELLI, C. & SIMMACO, M., "High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, and their main metabolites in human serum". *Therapeutic Drug Monitoring*. **34**(1): 53, 2012.
124. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **21**(18): 2863, 1998.
125. BRADFORD, M.M., "Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2): 248, 1976.
126. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices". *Quimica Nova*. **32**(4): 1021, 2009.
127. Food and Drug Administration; *Bioanalytical Method Validation*, 2001
128. "Guidance for Industry: Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. Final Guidance 118". *Food and Drug Administration. Washington, DC, USA*, 2003.
129. YU, Z.; WESTERLUND, D. & BOOS, K.S., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems". *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. **704**(1-2): 53, 1997.
130. FERREIRA, I.M.P.L.V.O., "Chromatographic Separation and Quantification of Major Human Milk Proteins". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **30**(4): 499, 2007.
131. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L., *Practical HPLC Method Development*. 2nd edition ed. 1997, New York: John Wiley and Sons.
132. BAO, Y.; ZHU, L. & NEWBURG, D.S., "Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis". *Analytical Biochemistry*. **370**(2): 206, 2007.

133. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.L., "Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures". *Journal of Chromatography A*. **1058**(1-2): 61, 2004.
134. BERG, T. & STRAND, D.H., "¹³C labelled internal standards-A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples?". *Journal of Chromatography A*. **1218**(52): 9366, 2011.
135. QUEIROZ, R.H.C.; BERTUCCI, C.; MALFARÁ, W.R.; DREOSSI, S.A.C.; CHAVES, A.R.; VALÉRIO, D.A.R. & QUEIROZ, M.E.C., "Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **48**(2): 428, 2008.
136. REZK, N.L.; ABDEL-MEGEED, M.F. & KASHUBA, A.D.M., "Development of a highly efficient extraction technique and specific multiplex assay for measuring antiretroviral drug concentrations in breast milk". *Therapeutic Drug Monitoring*. **29**(4): 429, 2007.
137. GENTILE, S., "Use of contemporary antidepressants during breastfeeding: A proposal for a specific safety index". *Drug Safety*. **30**(2): 107, 2007.
138. HATTON, D.C.; HARRISON-HOHNER, J.; COSTE, S.; DORATO, V.; CURET, L.B. & MCCARRON, D.A., "Symptoms of postpartum depression and breastfeeding". *Journal of Human Lactation*. **21**(4): 444, 2005.
139. WHITBY, D.H. & SMITH, K.M., "The use of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors in women who are breastfeeding". *Pharmacotherapy*. **25**(3): 411, 2005.
140. TADDIO, A.; ITO, S. & KOREN, G., "Excretion of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in human breast milk". *The Journal of Clinical Pharmacology*. **36**(1) 1996.
141. CACCIA, S., "Metabolism of the newer antidepressants: An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications". *Clinical Pharmacokinetics*. **34**(4): 281, 1998.

142. GENTILE, S.; ROSSI, A. & BELLANTUONO, C., "SSRIs during breastfeeding: Spotlight on milk-to-plasma ratio". *Archives of Women's Mental Health*. **10**(2): 39, 2007.
143. DEVANE, C.L., "Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors". *Cellular and Molecular Neurobiology*. **19**(4): 443, 1999.
144. HOSTETTER, A.L.; STOWE, Z.N.; COX, M. & RITCHIE, J.C., "A Novel System for the Determination of Antidepressant Concentrations in Human Breast Milk". *Therapeutic Drug Monitoring*. **26**(1): 47, 2004.
145. BURCH, K.J. & WELLS, B.G., "Fluoxetine/norfluoxetine concentrations in human milk". *Pediatrics*. **89**(4): 676, 1992.
146. BERLE, J.Ø.; STEEN, V.M.; AAMO, T.O.; BREILID, H.; ZAHNSEN, K. & SPIGSET, O., "Breastfeeding during maternal antidepressant treatment with serotonin reuptake inhibitors: Infant exposure, clinical symptoms, and cytochrome P450 genotypes". *Journal of Clinical Psychiatry*. **65**(9): 1228, 2004.
147. WEISSMAN, A.M.; LEVY, B.T.; HARTZ, A.J.; BENTLER, S.; DONOHUE, M.; ELLINGROD, V.L. & WISNER, K.L., "Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants". *American Journal of Psychiatry*. **161**(6): 1066, 2004.
148. SURI, R.; STOWE, Z.N.; HENDRICK, V.; HOSTETTER, A.; WIDAWSKI, M. & ALTSHULER, L.L., "Estimates of nursing infant daily dose of fluoxetine through breast milk". *Biological Psychiatry*. **52**(5): 446, 2002.
149. KRISTENSEN, J.H.; ILETT, K.F.; HACKETT, L.P.; YAPP, P.; PAECH, M. & BEGG, E.J., "Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **48**(4): 521, 1999.
150. ZOTOU, A., "An overview of recent advances in HPLC instrumentation". *Central European Journal of Chemistry*. **10**(3): 554, 2012.
151. MARÍN, J.M.; GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J.V.; LÓPEZ, F.J. & HERNÁNDEZ, F., "Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects". *Journal of Chromatography A*. **1216**(9): 1410, 2009.

152. PASCOE, R.; FOLEY, J.P. & GUSEV, A.I., "Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography". *Analytical Chemistry*. **73**(24): 6014, 2001.
153. MALEROD, H.; LUNDANES, E. & GREIBROKK, T., "Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography". *Analytical Methods*. **2**(2): 110, 2010.
154. SANDRA, P.; VANHOENACKER, G.; DAVID, F.; SANDRA, K. & PEREIRA, A., "Green chromatography (Part 1): Introduction and liquid chromatography". *LC-GC Europe*. **23**(5) 2010.
155. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N.M. & PEDRAZOLLI JR, J., "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **766**(1): 153, 2002.
156. CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & WAINER, I.W., "Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography". *Chirality*. **14**(9): 731, 2002.
157. FALLAS, M.M.; BUCKENMAIER, S.M.C. & MCCALLEY, D.V., "A comparison of overload behaviour for some sub 2 μ m totally porous and sub 3 μ m shell particle columns with ionised solutes". *Journal of Chromatography A*. **1235**: 49, 2012.
158. BALLARD, O. & MORROW, A.L., "Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors". *Pediatric Clinics of North America*. **60**(1): 49, 2013.
159. SANTOS-NETO, A.J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J.C.; ALVES, C. & LANÇAS, F.M., "Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system". *Journal of Separation Science*. **31**(1): 78, 2008.
160. KIM, J.; RIGGS, K.W.; MISRI, S.; KENT, N.; OBERLANDER, T.F.; GRUNAU, R.E.; FITZGERALD, C. & RURAK, D.W., "Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **61**(2): 155, 2006.