

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

**“ANÁLISE DE GLUCURONÍDEOS EM URINA HUMANA
COM INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA”**

Thaís Corrêa Castral

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

Orientadora: Quezia Bezerra Cass

* bolsista Fapesp no período de 01/09/2009 até 28/02/2010

São Carlos – SP

2013

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

C355ag Castral, Thaís Corrêa.
Análise de glucuronídeos em urina humana com injeção
direta de amostras por cromatografia líquida acoplada à
espectrometria de massa / Thaís Corrêa Castral. -- São
Carlos : UFSCar, 2014.
148 f.

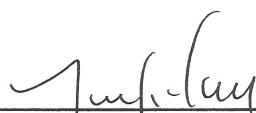
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2013.

1. Cromatografia líquida. 2. Glucuronídeos. 3. Urina. 4.
RAM-BSA. 5. LC-MS. I. Título.

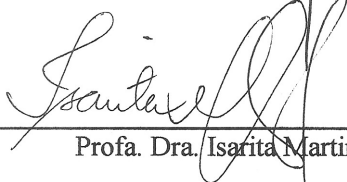
CDD: 543.0894 (20^a)

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 **Thais Corrêa Castral**, realizada em 17 de dezembro de 2013:*



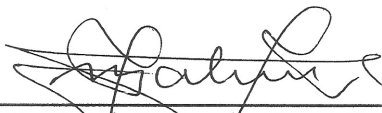
Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



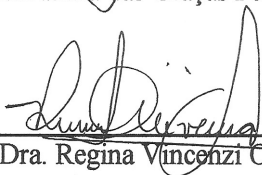
Prof. Dra. Isarita Martins Sakakibara



Dr. Valdemir Melechco Carvalho



Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



Prof. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Dedico esta tese....

*.....aos meu pais que
incentivaram meus estudos por toda a minha vida.*

*.....ao meu marido por entender a minha “ausência”,
mesmo estando ao seu lado, no dia a dia.*

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até este momento.

À Profa. Dra. Quezia B. Cass, pela orientação, amizade, ensinamentos e por permitir que eu desse continuidade ao trabalho de doutorado após ter assumido o cargo de Química no Departamento de Engenharia Química desta universidade.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi, por ceder amostras de urina.

Aos meus pais Arlete e João e minha irmã Thaíla, pelo apoio irrestrito.

Ao meu marido Othon Paranhos, por ser ombro amigo e incentivador dia após dia.

À Dra. Bianca Rebelo Lopes Simões, pela colaboração durante o desenrolar deste trabalho e, especialmente, pela amizade.

À Profa. Dra. Arlene G. Corrêa, pelas contribuições na escrita desta tese.

Aos amigos do grupo: Juliana Barreiro, Bianca Ferreira, Neila Cassiano, Marina Denadai, Kenia Vanzolini, Roberta Belaz, Franciane Moura, Marcela Moraes, Ricardo Sprenger, Josiane Cardoso, Profa. Dra. Regina Oliveira, Paulo Adalberto, Fernando Almeida, Gabriel Scatena, Marili Rodrigues, Amanda Aquino, Bruna Neto, Tiago Lourenço e Adriana Sales.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Química, em especial à Alyne Veroli e Alexandra Gonçalves.

Ao corpo técnico do Departamento de Química e às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar, pela competência em suas funções e que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Química, pelos ensinamentos transmitidos desde a graduação até o término deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química, pelo afastamento concedido, essencial para viabilizar o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pelos seis meses de bolsa concedida e por todo apoio financeiro e aos demais órgãos de fomento CNPq e CAPES.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Trabalhos publicados na literatura que empregam quantificação direta de glucuronídeo em urina.	9
TABELA 1. 2: Emprego de colunas RAM na análise de compostos na matriz urina – adaptado da referência ⁴⁹	25
TABELA 4. 1: Fases móveis usadas na avaliação da exclusão das macromoléculas da urina na RAM-BSA C ₈	63
TABELA 4. 2: Fases móveis avaliadas na exclusão das macromoléculas da urina na coluna RAM-BSA SAX.....	65
TABELA 4. 3: Condições empregadas na coluna extratora RAM BSA C ₈ (50 x 2,1 mm, 10 µm)	69
TABELA 4. 4: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM-BSA C ₈ x C ₈	70
TABELA 4. 5: Condições de ionização e fragmentação para FG por ESI.	74
TABELA 4. 6: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM BSA C ₈ x BEH-Fenil - Volume de injeção: 10 µL, vazão: 0,3 mL/min.....	77
TABELA 4. 7: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM BSA C ₈ x Ascentis Express F5 - Vazão: 0,2 mL/min	81
TABELA 4. 8: Condições de ionização otimizadas para o FG no sistema LC-IT-MS/MS	83
TABELA 4. 9: Condições cromatográficas – coluna RAM BSA C ₈ x Ascentis Express F5; Vazão: 0,2 mL/min, volume de injeção: 20 µL.....	85
TABELA 4. 10: Efeito de matriz segundo preconizado pela EMEA	90
TABELA 4. 11: Precisão e exatidão intra e interlote (n = 5).....	92
TABELA 4. 12: Estabilidade de autoinjeter para o FG - temperatura ambiente	93

TABELA 4. 13: Degelo para o FG – ciclo de 48 horas a - 20 °C	93
TABELA 4. 14: Análise de urinas individuais por padronização externa..	94
TABELA 4. 15: Análise de urinas individuais e da amostra-padrão de <i>pool</i> fortificado - calibração por adição de padrão.....	95
TABELA 4. 16: Condições empregadas no acoplamento entre RAM BSA C ₈ x BEH Fenil - NFG, volume de injeção: 10 µL, vazão: 0,3 mL/min.....	98
TABELA 4. 17: Condições de ionização e fragmentação para NFG por ESI	100
TABELA 4. 18: Condições empregadas no acoplamento entre a coluna RAM BSA C ₈ x ZIC-HILIC Vazão: 0,3 mL/min	108
TABELA 4. 19: Condições de ionização do NFG sendo o íon precursor o <i>m/z</i> 138	110
TABELA 4. 20: Condições cromatográficas otimizadas para o acoplamento entre a coluna RAM BSA C ₈ x ZIC-HILIC	111
TABELA 4. 21: Condições de ionização obtida para o NFG no sistema <i>ion trap</i>	116
TABELA 4. 22: Condições cromatográficas – coluna RAM BSA C ₈	117
TABELA 4. 23: Dados obtidos para EM, RE e EP	121
TABELA 4. 24: Precisão e exatidão intra e interlote (n = 5).....	123
TABELA 4. 25: Estabilidade de autoinjeter para o NFG	123
TABELA 4. 26: Degelo para o NFG	124
TABELA 4. 27: Análise individual das urinas que compunham o <i>pool</i> de urinas após fortificação com NFG	125
TABELA 4. 28: Exatidão encontrada para urinas individuais calculadas pelo método de adição de padrão	126

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1: Cofator UDP-ácido glucurônico (UDPGA).....	4
FIGURA 1. 2: Reação de glucuronidação via S _N -2	5
FIGURA 1. 3: Reação de glucuronidação via S _N -1.	6
FIGURA 1. 4: Composição da urina humana – adaptado da referência ²³ ...	8
FIGURA 1. 5: Experimentos realizados no <i>QqQ</i> – adaptado da referência ⁵²	13
FIGURA 1. 6: Estrutura do dimetoato	14
FIGURA 1. 7: Experimentos realizados no IT	15
FIGURA 1. 8: Protocolo para avaliação de ME, RE e EP adaptado de Trufelli et al. ⁶¹	18
FIGURA 1. 9: Exclusão das proteínas e retenção das pequenas moléculas na fase hidrofóbica da coluna RAM. Adaptado de Mullett, W. ⁷⁰	22
FIGURA 1. 10: Sistema multidimensional; A: exclusão das macromoléculas e condicionamento da coluna analítica; B: Acoplamento entre as colunas	24
FIGURA 1. 11: Glucuronídeos selecionados para o estudo	27
FIGURA 4. 1: Parâmetros que devem ser avaliados no desenvolvimento de um método 2D-LC-MS/MS.....	60
FIGURA 4. 2: Suportes cromatográficos selecionados para o preparo das fases do tipo RAM-BSA	61
FIGURA 4. 3: Cromatograma referente à exclusão das macromoléculas da urina pela RAM-BSA C ₈ . Fase móvel: 99% água purificada/1% ACN, vazão: 0,5 mL/min, λ: 254 nm, volume de injeção: 50 μL	63

FIGURA 4. 4: Gráfico referente à influência do pH na retenção do FG na coluna RAM-BSA C ₈ . Fase móvel: 95% tampão fosfato 10 mM, 5% ACN, vazão: 0,5 mL/min, 254 nm, volume de injeção: 50 µL	64
FIGURA 4. 5: Perfil de exclusão das macromoléculas da urina pela RAM-BSA SAX. Fase móvel: Formiato de amônio 1mM pH 5, vazão: 0,5 mL/min, λ: 254 nm, volume de injeção: 50 µL.....	65
FIGURA 4. 6: Gráfico referente à influência do pH na retenção do FG na coluna SAX Nucleosil. Fase móvel: tampão formiato de amônio 40 mM, vazão: 0,5 mL/min, λ: 254 nm, volume de injeção: 50 µL	66
FIGURA 4. 7: Comparação entre o perfil de retenção da coluna SAX Nucleosil (A) e da coluna RAM-BSA SAX (B). Vazão de 0,5 mL/min, λ= 266 nm, coluna SAX 50 x 2,1 mm, injeção de 50 µL.....	67
FIGURA 4. 8: Cromatograma de íons totais do estudo da variação do percentual de ACN (10 a 40%) na fase móvel utilizada na retenção do FG na coluna RAM-BSA C ₈ ; ESI ⁻ ; SRM m/z 269,1 → 92,60 e m/z 269,1 → 113,0.....	70
FIGURA 4. 9: Válvulas que compõem o sistema UHPLC-MS/MS. A) Sistema desacoplado e B) Sistema durante o acoplamento	72
FIGURA 4. 10: Estrutura do FG e seus íons-fragmentos	73
FIGURA 4. 11: Cromatograma de íons totais obtido para o FG no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C ₈ e a coluna analítica C ₈ ; ESI ⁻ ; SRM m/z 269,1 → 92,60 e m/z 269,1 → 113,0.....	74
FIGURA 4. 12: Cromatograma de íons totais referente à banda observada no tempo de retenção do FG na análise de urina branca; ESI ⁻ ; SRM m/z 269,1 → 92,60 e m/z 269,1 → 113,0.....	75
FIGURA 4. 13: Equação de Van Deenter.....	76
FIGURA 4. 14: Cromatograma de íons totais obtido para o FG no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C ₈ e a coluna analítica BEH-Fenil; ESI ⁻ ; SRM m/z 269,1 → 92,60 e m/z 269,1 → 113,0.....	78

FIGURA 4. 15: Cromatograma de íons totais - avaliação do percentual de ACN na fase móvel da primeira dimensão - sistema LC-IT-MS/MS.....	79
FIGURA 4. 16: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 – definição de novo intervalo de acoplamento (7,9-9,1 min) - sistema LC-IT-MS/MS	80
FIGURA 4. 17: Esquema representando o sistema 2D-LC-IT-MS/MS utilizado.....	82
FIGURA 4. 18: Espectro de massa obtido para o FG no <i>ion trap</i>	83
FIGURA 4. 19: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 – comparação entre a intensidade do sinal do FG antes e após acoplamento - sistema LC-IT-MS/MS.....	83
FIGURA 4. 20: Cromatograma de íons totais – metanol como modificador orgânico - sistema LC-IT-MS/MS	84
FIGURA 4. 21: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 - FG em condições de acoplamento - sistema LC-IT-MS/MS	86
FIGURA 4. 22: Cromatogramas de íons extraídos m/z 113 – Comparação entre urinas brancas e urina fortificada com FG (1,0 $\mu\text{g/mL}$) - sistema LC-IT-MS/MS.....	87
FIGURA 4. 23: A) Espectro de massa referente ao FG em água B) Espectro de massa referente à urina branca	88
FIGURA 4. 24: EM qualitativo - Infusão pós-coluna.....	89
FIGURA 4. 25: Cromatograma de íons totais - Efeito de matriz qualitativo para o FG.....	89
FIGURA 4. 26: Curva de calibração para o FG em urina.....	91
FIGURA 4. 27: Exemplo de curva por adição de padrão	95
FIGURA 4. 28: Cromatograma de íons totais referente à variação do percentual de ACN como modificador orgânico na fase móvel de transferência (ACN + 0,1% AF/água + 0,1% AF); ESI ⁻ ; SRM, m/z 314,2 \rightarrow 138,0 e m/z 314,2 \rightarrow 112,9.....	97
FIGURA 4. 29: Estrutura do NFG e seus íons-fragmentos	99

FIGURA 4. 30: Cromatogramas de íons totais referentes à: A) Análise de água fortificada com NFG, água pura e urina branca. B) Análise de água fortificada com FG, água pura e urina branca; ESI ⁻ ; SRM, m/z 314,2 → 138,0 e m/z 314,2 → 112,9.....	101
FIGURA 4. 31: Cromatogramas de íons totais obtidos para o padrão de NFG em urina artificial a 130 ng/mL e injeção de urina artificial branca; ESI ⁻ ; SRM, m/z 314,2 → 138,0 e m/z 314,2 → 112,9.....	102
FIGURA 4. 32: Cromatograma de íons totais obtidos para a urina branca no experimento de perda neutra (176 Da).....	103
FIGURA 4. 33: Espectro de massa da banda detectada na urina branca (7,32 min) no experimento de perda neutra	104
FIGURA 4. 34: Experimento de perda neutra: íons extraídos, cone 18 V, capilar 2 KV, m/z 178 a m/z 1000 Da, energia de colisão de 22 eV.	105
FIGURA 4. 35: Mecanismo de separação no modo HILIC – adaptado da referência ¹³³	106
FIGURA 4. 36: Fase estacionária ZIC-HILIC e seu mecanismo de retenção – adaptado da referência ¹³⁵	107
FIGURA 4. 37: Cromatograma de íons totais comparando-se NFG em água (500 ng/mL), NFG em urina (500 ng/mL) e urina branca no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C ₈ - ZIC-HILIC; ESI ⁻ ; SRM, m/z 314,2 → 138,0 e m/z 314,2 → 112,9.....	109
FIGURA 4. 38: Proposta de fragmentação do íon m/z 138	110
FIGURA 4. 39: Cromatograma íons totais comparando-se análise de NFG em água (500 ng/mL) e urina branca na coluna RAM-BSA C ₈ ; ESI ⁻ ; SRM, m/z 138 → 92,0 e m/z 138 → 108	112
FIGURA 4. 40: NFG 200 ng/mL em água. Acoplamento RAM-BSA C ₈ - ZIC-HILIC. SRM-ESI ⁻ , cone 50 V e capilar 2 KV. Transições consideradas: (138 → 108, 138 → 92,0).....	113

FIGURA 4. 41: Variação da concentração de NFG (200 a 400 ng/mL) em água em relação à área obtida	114
FIGURA 4. 42: Esquema representativo do sistema LC-IT em uma dimensão	115
FIGURA 4. 43: Espectro de massa obtido para o NFG no <i>ion trap</i>	116
FIGURA 4. 44: Seletividade – Comparação da urina branca com água fortificada com NFG - <i>m/z</i> 138 extraído	118
FIGURA 4. 45: Cromatogramas das urinas brancas em comparação com a urina fortificada com NFG – <i>m/z</i> 138 extraído	119
FIGURA 4. 46: Efeito de matriz qualitativo para o NFG - <i>m/z</i> 138 extraído	120
FIGURA 4. 47: Curvas de calibração para o NFG em urina	122

RESUMO

ANÁLISE DE GLUCURONÍDEOS EM URINA HUMANA COM INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA

Este trabalho descreve os resultados obtidos nos estudos feitos para quantificar fenil- β -D-glucuronídeo (FG) e nitrofenil- β -D-glucuronídeo (NFG), em urina humana por injeção direta de amostra, utilizando-se sistemas LC-MS/MS. Para injeção direta de amostras, as colunas RAM-BSA SAX e RAM-BSA C₈ foram preparadas e avaliadas em relação à capacidade de exclusão das macromoléculas da urina e à capacidade de retenção do FG. Ambas as colunas apresentaram boa capacidade de retenção para o glucuronídeo, no entanto, quanto à exclusão, a coluna RAM-BSA SAX mostrou-se mais eficiente, visto que nesta coluna não houve eluição de interferentes, após o tempo de exclusão. Porém, a coluna RAM-BSA SAX não pode ser utilizada para a quantificação de FG por LC-MS/MS, pois as condições cromatográficas estabelecidas para esta coluna envolveram alta concentração de tampão (formiato de amônio 40 mM), o que acarretou na supressão total do sinal referente ao FG. Portanto, a coluna RAM-BSA C₈ foi selecionada para o desenvolvimento dos métodos. Neste trabalho avaliaram-se os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e *ion trap* (IT) para ambos os glucuronídeos estudados. Nas condições analíticas desenvolvidas utilizando-se UHPLC-QqQ, não foi possível se obter seletividade. Quando o IT foi utilizado como analisador, a seletividade foi obtida no modo multidimensional para o FG, utilizando-se a coluna RAM-BSA C₈ na primeira dimensão e a coluna Ascentis Express F5 na segunda dimensão, e no modo simples para o NFG. As figuras de méritos obtidas por padronização externa, a

partir de uma curva construída fortificando-se um *pool* de urinas, foram exatas e precisas, com LQ de 1,0 µg/mL e LD de 0,5 µg/mL, para FG, e LQ de 4,0 µg/mL e LD de 3,0 µg/mL, para o NFG. Para aplicação dos métodos, a calibração por adição de padrão foi adotada para contornar as diferenças individuais entre as urinas dos doadores. Das seis amostras toxicológicas analisadas, uma amostra ultrapassou o valor de referência da normalidade para fenol urinário. Para o NFG, na ausência de amostras toxicológicas, o método foi aplicado em amostras-padrão preparadas no laboratório.

ABSTRACT

GLUCURONIDE ANALYSIS WITH DIRECT INJECTION OF HUMAN URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

This work describes the results obtained from studies carried out to quantify phenyl- β -D-glucuronide (FG) and nitrophenyl- β -D-glucuronide (NFG) in human urine by direct injection sample using LC-MS/MS system. The columns RAM-BSA SAX and RAM-BSA C8 were prepared and evaluated in relation to their exclusion capability of urine macromolecules and retention capability of FG by direct injection samples. Both columns presented good retention capability for glucuronide, however, the RAM-BSA SAX column was more efficient in exclusion since this column did not have any interferences eluting after the exclusion time. However, the RAM-BSA SAX column can not be used for FG quantification by LC-MS/MS because the chromatographic condition of this column presented high buffer concentration (40 mM ammonium formate), which resulted in total suppression of the FG signal. Therefore, the column RAM-BSA C₈ was selected for the development of the methods. In this study we evaluated triple quadrupole (QqQ) and ion trap (IT) mass spectrometry for both selected glucuronides. It was not possible to obtain selectivity in the analytical conditions developed using UHPLC-QqQ. When we used the IT analyzer, we obtained selectivity in a multidimensional mode for the FG using the column RAM-BSA C8 in the first dimension and the column Ascentis Express F5 in the second dimension. For the NFG we achieved selectivity in a unidimensional mode. The figures of merit obtained with external standardization calibration curve with spiked pooled urines were accurate and precise. For FG, the LQ and LD were 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and to NFG, the

LQ and LD were 4.0 $\mu\text{g/mL}$ and 3.0 $\mu\text{g/mL}$. For the method application we adopted calibration by standard addition to minimize the individual differences between urine donors. To all six toxicological samples analyzed, just one exceeded the regulatory limits for urinary phenol. For NFG, there were no toxicological samples available, thus the method was applied in spiked samples in the laboratory.

SUMÁRIO

1. Introdução	3
1.1. Glucuronídeos	3
1.2. Sistema LC-MS/MS	10
1.3. Preparo de amostra	19
1.4. Colunas RAM e a matriz urina	24
1.5. Glucuronídeos selecionados para o estudo	27
2. Objetivos	29
3. Procedimento Experimental	31
3.1. Generalidades	31
3.2. Preparo e avaliação das colunas RAM-BSA	33
3.3. Quantificação de fenil- β -D-glucuronídeo (FG) em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS	35
3.3.1. Condições analíticas avaliadas no sistema UHPLC-QqQ para quantificação de FG	35
Acoplamento RAM-BSA C ₈ - C ₈	36
Acoplamento RAM-BSA C ₈ - Acquity UPLC BEH Fenil	37
Preparo de soluções e amostras	38
3.3.2. Desenvolvimento de método para quantificação de FG por LC-IT- MS/MS	39
Preparo das soluções de trabalho	40
Preparo das amostras	41
Validação do método	41
Aplicação do método	43
Adição de padrão	43

3.4. Quantificação de nitrofenil- β -D-glucuronídeo (NFG) em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS.....	44
3.4.1. Condições analíticas avaliadas no sistema UHPLC-QqQ para quantificação de NFG	44
Acoplamento RAM-BSA C ₈ - Acquity UPLC BEH Fenil	44
Preparo de soluções e amostras.....	46
Acoplamento RAM-BSA C ₈ - ZIC-HILIC.....	47
Preparo de soluções e amostras.....	48
3.4.2. Desenvolvimento de método para quantificação de NFG por LC-IT-MS/MS	49
Preparo das soluções de trabalho	51
Preparo das amostras.....	52
Validação	53
Aplicação do método	55
Adição de padrão	55
4. Resultados e Discussões.....	59
4.1. Quantificação de fenil- β -D-glucuronídeo em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS	59
4.1.1. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema UHPLC-QqQ...	60
Avaliação das colunas RAM-BSA.....	60
Acoplamento	68
Sistema 2D-LC-MS/MS.....	71
4.1.2. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema LC-IT-MS/MS.	78
Avaliação da RAM-BSA C ₈	78
Acoplamento	80
Sistema 2D-LC-IT-MS/MS.....	82
Validação	86
Seletividade	86
Efeito de Matriz	88

Linearidade.....	90
Precisão e Exatidão	91
Estabilidade.....	92
Aplicação do método	93
4.2. Quantificação de <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucuronídeo em urina por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS	96
4.2.1. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema UHPLC-QqQ para o NFG.....	96
Ajuste das condições cromatográficas	96
Sistema 2D-LC-MS/MS.....	98
4.2.2. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema LC-IT-MS/MS para o NFG.....	115
Sistema LC- MS/MS.....	115
Ajuste das condições da coluna RAM-BSA C ₈	117
Validação	118
Seletividade.....	118
Efeito de Matriz (EM), Recuperação (RE) e Eficiência do Processo (EP)	119
Linearidade.....	121
Precisão e Exatidão	122
Estabilidade.....	123
Aplicação do método	124
5. Conclusões e Perspectivas	129
6. Referências.....	133
ANEXO.....	147

INTRODUÇÃO

" O único lugar onde o sucesso vem antes que o trabalho é no dicionário." (Albert Einstein)

1. Introdução

1.1. Glucuronídeos

Xenobióticos são substâncias estranhas para o organismo¹ e podem ser eliminados tanto na forma inalterada quanto metabolizados. Quando esses compostos apresentam polaridade elevada são facilmente excretados, no entanto, os lipofílicos são metabolizados, a fim de serem transformados em compostos mais polares e de fácil excreção.²⁻⁶

A biotransformação é um processo complexo que engloba etapas de absorção, distribuição e excreção. A biotransformação de xenobióticos envolve um sistema enzimático e pode ser dividida em duas etapas, denominadas reações de fase I e de fase II. As reações de fase I consistem em: oxidação, redução e hidrólise, promovendo a funcionalização dos xenobióticos, tornando-os aptos a sofrerem as reações de fase II. Já nas reações de fase II, ocorre a conjugação entre substratos endógenos (ácido glucurônico, sulfato, acetato ou aminoácidos) e os metabólitos funcionalizados resultantes das reações de fase I^{2,7,8}. De forma geral, os grupos funcionais suscetíveis às reações de fase II são alcoóis, hidroxilaminas, ácido carboxílico, aminas, sulfonamidas e tióis.

Em relação à glucuronidação, o cofator envolvido é o UDP (uridina difosfato) - ácido glucurônico (UDPGA) (FIGURA 1.1), e a enzima que catalisa diretamente essa reação é a UDP-glucuronosiltransferase⁹. O UDPGA é encontrado em todos os tecidos do corpo humano e faz parte do metabolismo intermediário que se relaciona com a síntese de glicogênio¹⁰.

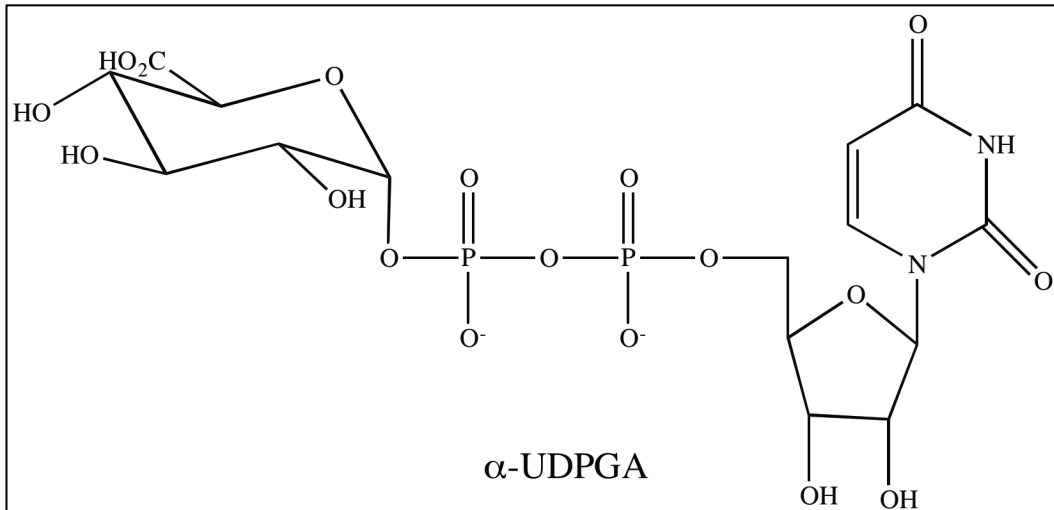


FIGURA 1. 1: Cofator UDP-ácido glucurônico (UDPGA)

Pode-se notar que o carbono 1 da porção ácido glucurônico da UDPGA tem configuração α , e, durante a transferência para o substrato, ocorre a inversão de configuração por um mecanismo via S_N-2 , formando β -glucuronídeo (FIGURA 1.2).

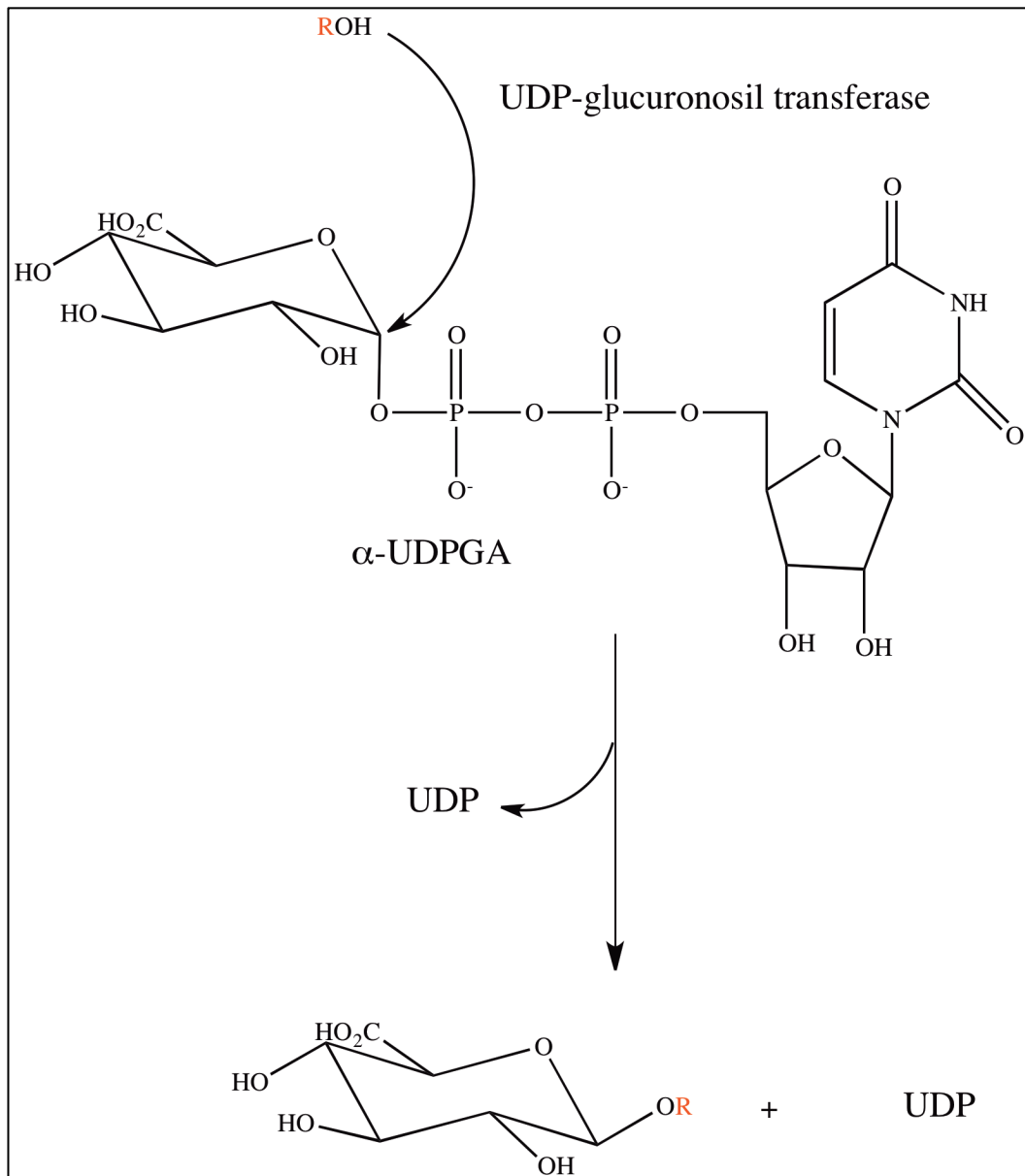


FIGURA 1. 2: Reação de glucuronidação via S_N2

Esse mecanismo é aceito como o mais provável na formação de glucuronídeos por diversos autores.^{4,9,11,12} No entanto, a reatividade via S_N1 também é pronunciada, visto que o oxigênio vizinho ao carbono anomérico, com a saída do grupo abandonador, estabiliza o carbocátion formado, conforme pode ser observado no esquema da FIGURA 1.3.

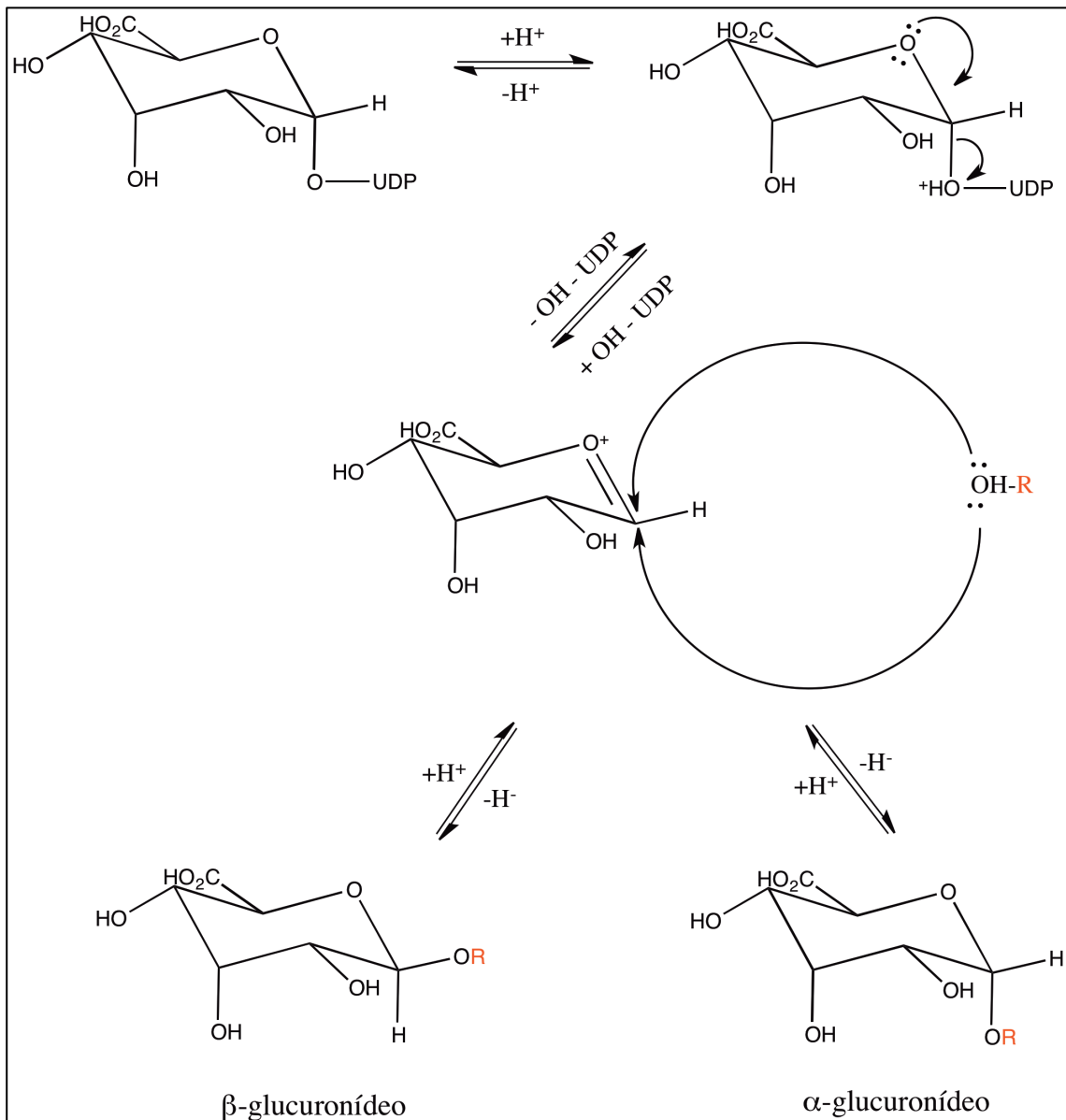


FIGURA 1. 3: Reação de glucuronidação via S_N-1.

A glucuronidação é uma das reações de metabolização mais relevantes quando se trata de xenobióticos, sendo 40-70% desses metabolizados por esta via e, posteriormente, excretados na bile e urina, na forma de metabólitos, em geral, inativos¹³. No entanto, glucuronídeos bioativos ou tóxicos também podem ser formados, como, por exemplo, a morfina-6-glucuronídeo que é um analgésico mais potente que a própria morfina¹⁴. Considerando, ainda, que xenobióticos possuem tempo de meia-

vida relativamente curto (2 a 3 dias), ensaios para a detecção e/ou quantificação destes devem ser realizados preferencialmente logo após a coleta do material biológico, o que dificulta a rotina nas áreas de análises clínicas, forenses, no controle do doping, em estudos de toxicidade e no desenvolvimento de novos fármacos.¹⁵⁻²⁰ Dessa forma, a quantificação de glucuronídeos torna-se uma alternativa interessante já que prolonga o tempo para a detecção dos xenobióticos nos fluídos biológicos¹⁵.

Portanto, é de extrema importância que existam métodos precisos e capazes de detectar e quantificar glucuronídeos em matrizes biológicas, em especial na urina. A urina é resultante da excreção renal, sendo a urina humana composta principalmente de água (95%, em média)²¹, ureia, ácido úrico, sais, creatinina, aminoácidos, fosfolipídeos, além de outras substâncias que representam 0,2% do total, como proteínas, hormônios, enzimas e metabólitos hidrossolúveis (FIGURA 1.4). Em resumo, na urina estão presentes compostos ácidos, básicos e neutros e ainda endógenos de elevada polaridade, o que torna a quantificação de analitos nesta matriz um desafio. Esta tarefa passa a ser mais difícil e interessante, quando o objetivo é a quantificação de compostos tão polares quanto os interferentes presentes na matriz. Assim, a quantificação de glucuronídeos em urina é uma tarefa desafiadora. Vale ressaltar que, embora a urina seja complexa, é uma matriz muito adequada para ser utilizada analiticamente, pois é obtida de forma não invasiva.²²

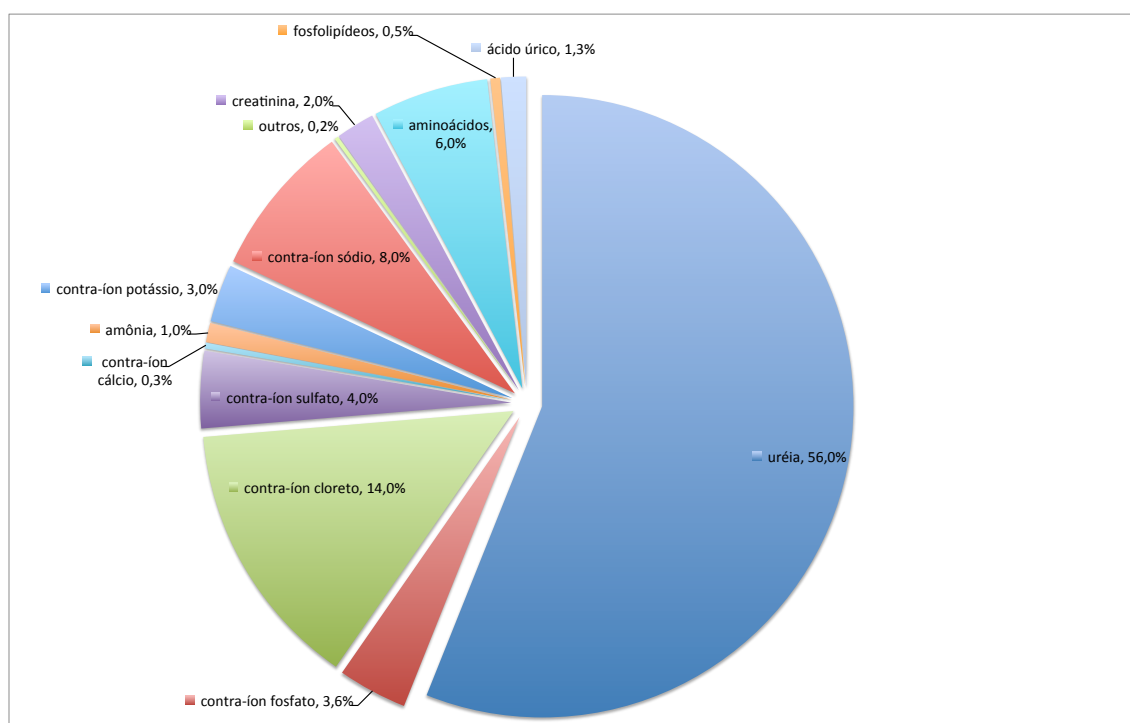


FIGURA 1. 4: Composição da urina humana – adaptado da referência ²³

Os métodos clássicos de análise de glucuronídeo em fluidos biológicos empregam hidrólise ácida ou enzimática (incubação dos glucuronídeos com β -glucuronidase)²⁴⁻²⁹ e, em seguida, procede-se à quantificação da aglicona, geralmente apolar. Quando a técnica de cromatografia gasosa (CG) é utilizada, uma etapa adicional de derivação da amostra torna-se necessária.³⁰⁻³² Conseqüentemente, reações paralelas gerando subprodutos podem ocorrer, ocasionando problemas de precisão e exatidão no método.

Sendo assim, estudos estão sendo realizados com a finalidade de desenvolver métodos para quantificar glucuronídeos sem hidrólise prévia. Alguns exemplos estão listados na TABELA 1.1. No entanto, para que a quantificação direta de glucuronídeo em urina seja viável, recomenda-se um preparo de amostra adequado e a utilização de sistemas LC-MS/MS, já que se trata da análise de um analito em baixa concentração inserido em uma matriz complexa.

TABELA 1. 1: Trabalhos publicados na literatura que empregam quantificação direta de glucuronídeo em urina.

Analitos (s)	Sistema LC-MS/MS	Fonte de ionização	Tratamento da amostra	Ref.
Etil-glucuronídeo	LC-Q-Trap-MS/MS	ESI ⁻	Precipitação de proteína com MeOH, centrifugação e concentração da amostra	33
Metabólitos do diazepam: oxazepam e temazepam glucuronídeos	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	SPE (Oasis HLB)	15
<i>Screening</i> de Glucuronídeos de esteroides	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁻	Liofilização, LLE e SPE (SAX)	34
cTHC-glucuronídeo	LC-IT-MS/MS	ESI ⁺	Diluição e centrifugação	35
Bisphenol-A glucuronídeo	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁻	SPE (Sep-Pack C18)	36
Glucuronídeos da morfina	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	Centrifugação e diluição	37
Ácido micofenólico glucuronídeo (MPAG) e Ácido micofenólico acil glucuronídeo (AcMPAG)	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	Precipitação de proteínas, diluição e centrifugação automatizadas utilizando placas de 96 poços	38

continua a seguir

TABELA 1. 1: Trabalhos publicados na literatura que empregam quantificação direta de glucuronídeo em urina - *continuação*

Analitos (s)	Sistema LC-MS/MS	Fonte de ionização	Tratamento da amostra	Ref.
N-acetil-p-aminofenol glucuronídeo	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	Diluição e centrifugação	39
Deoxinovalenol-3-O-glucuronídeo	LC-Q-Trap-MS/MS	ESI ⁻	Diluição e centrifugação	40
Asenapina-N ⁺ -glucuronídeo	LC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	SPE online (Oasis HLB)	41
Bromofenol glucuronídeo	LC-Q-Trap-MS/MS	ESI ⁺	LLE e SPE (WAX)	42
Nicotina-N-β-D-glucuronídeo e Cotinina- N-β-D-glucuronídeo	UHPLC-QqQ-MS/MS	ESI ⁺	SPE (Oasis HLB e MCX em série)	43

1.2. Sistema LC-MS/MS

Os sistemas LC-MS/MS tornaram-se indispensáveis na quantificação de compostos com baixa concentração em matrizes biológicas, pois se trata de uma técnica analítica que agrega alta seletividade, sensibilidade e eficiência de separação com a possibilidade de obtenção de informações estruturais referentes aos analitos.⁴⁴

As interfaces de ionização à pressão atmosférica (API) são comumente empregadas, dentre elas a ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI). A ESI é uma técnica de

ionização branda, na qual geralmente ocorre a protonação $[M+H]^+$ ou a deprotonação do analito $[M-H]^-$ no modo positivo e negativo de análise, respectivamente. A ESI é eficiente especialmente quando se trata de compostos polares e, como a ionização do analito ocorre em solução (fase móvel em LC), compostos termolábeis não estão sujeitos à degradação.⁴⁵⁻⁴⁸

A APCI pode ser considerada uma técnica complementar à ESI, já que é eficiente para analitos apolares ou pouco polares e, necessariamente, termoestáveis.^{45,46}

Em relação aos analisadores de massa na análise de pequenas e grandes moléculas, os mais utilizados são quadrupolos (Q), *ion traps* (IT) e *time-of-flight* (TOF). Nas últimas décadas, o progresso tecnológico da espectrometria de massa permitiu o acoplamento entre os analisadores, dando origem à espectrometria de massa *Tandem*, sendo o triplo quadrupolo (QqQ) um dos analisadores mais empregados e difundidos. Também surgiram analisadores híbridos, como, por exemplo, o quadrupolo-*ion trap* (QTrap) e quadrupolo-*time-of-flight* (QTOF).⁴⁹

O QqQ é muito utilizado para quantificação, sendo bastante versátil, pois permite a realização de experimentos que fornecem informações estruturais sobre o analito em estudo. Os experimentos mais comuns são varredura de íons totais (*full MS scan*), varredura de íon-produto (*product ion scan*), varredura de íon-precursor (*precursor ion scan*), varredura da perda de fragmento neutro (*neutral loss*) e monitoramento de reação selecionada (*SRM*).⁵⁰

No experimento de *full MS scan*, todos os íons são detectados sem sofrer fragmentação, ou seja, os quadrupolos funcionam apenas como filtros de massa. Neste modo de aquisição, no QqQ, a sensibilidade é baixa, pois o equipamento analisa continuamente diversos íons ao mesmo tempo. Já o experimento de *product ion scan* é amplamente utilizado e pode

fornecer informações estruturais importantes sobre a molécula analisada. Neste experimento um íon-precursor de m/z específico é selecionado no primeiro quadrupolo, fragmentado no segundo quadrupolo que funciona como uma célula de colisão induzida (CID) pela presença de um gás inerte, geralmente argônio, e no terceiro quadrupolo é realizada uma varredura de íons produto. No experimento de *precursor ion scan*, um íon produto de m/z específica é selecionado no terceiro quadrupolo e realiza-se uma varredura no primeiro quadrupolo em uma faixa de massa específica, filtrando íons que darão origem ao íon produto pré-selecionado. No modo *neutral loss scan*, os dois analisadores de massa (Q1 e Q3) são sintonizados para monitorar uma mesma diferença de massa constante. O espectro de massa resultante apresenta íons-produtos obtidos a partir da perda de um fragmento neutro de massa específica dos íons-precursores, muito útil quando uma classe de compostos sofre uma etapa comum de fragmentação. O modo *selected reaction monitoring* (SRM) é o preferido para a quantificação de moléculas em diversas matrizes, pois permite aumento da seletividade e da sensibilidade por meio do monitoramento de transições específicas da molécula em estudo. Nesse modo, no primeiro quadrupolo seleciona-se o íon-precursor determinado. No segundo quadrupolo, que atua como CID, ocorre a fragmentação deste íon-precursor, gerando íons-produtos. No terceiro quadrupolo, os íons-fragmentos selecionados são filtrados. A representação dos experimentos realizados em um triplo quadrupolo está na FIGURA 1.5.^{46,51}

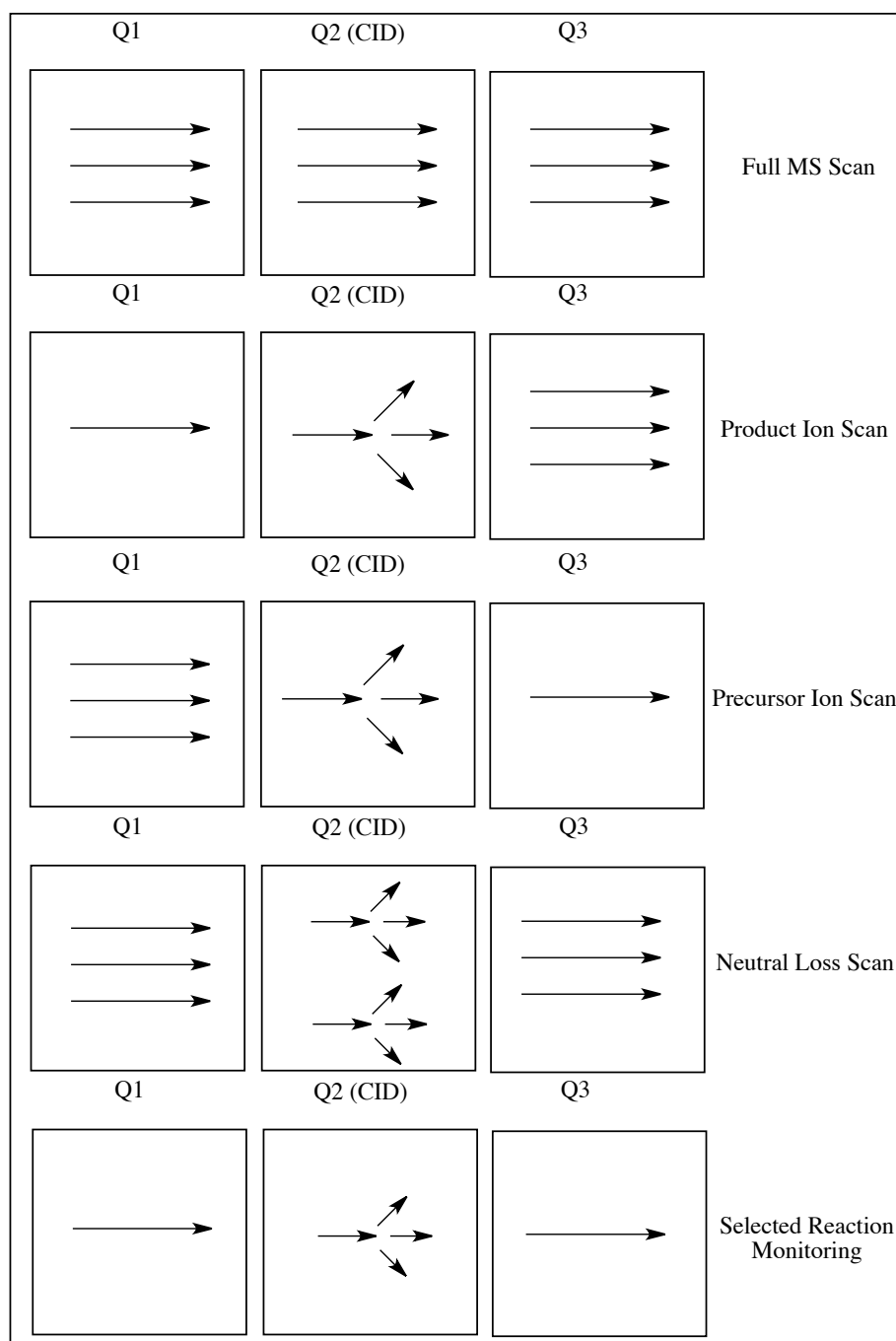


FIGURA 1. 5: Experimentos realizados no QqQ – adaptado da referência⁵²

Embora esses experimentos sejam ferramentas úteis e forneçam informações valiosas, uma avaliação criteriosa dos dados obtidos deve ser realizada. Pozo et al.⁵³ descrevem resultados falso-positivos e falso-negativos em relação à quantificação de poluentes orgânicos em

matrizes ambientais. Um dos exemplos mais interessantes abordados foi em relação à quantificação do dimetoato (FIGURA 1.6) em água.

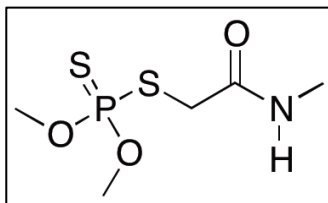


FIGURA 1. 6: Estrutura do dimetoato

A transição selecionada para quantificação foi m/z 230 \rightarrow 125. Esta transição é específica, pois se refere à perda neutra do fragmento $\text{CH}_3\text{NHCOCH}_2\text{SH}$. No entanto, se apenas esta transição fosse monitorada, um resultado de falso-positivo seria obtido. Os autores avaliaram diferentes amostras de água, livres de dimetoato (branco), e detectaram sinal nesta transição, com variação de retenção em relação ao padrão de apenas 0,9%. No entanto, utilizando-se a transição m/z 230 \rightarrow 199 para confirmação, os autores reconheceram o falso-positivo. Portanto, é necessário o uso de ao menos duas transições, de preferência específicas, para confirmar a presença do analito de interesse, sempre em comparação ao tempo de retenção do padrão analítico. Porém, esta recomendação se torna um desafio, quando se trata de moléculas pequenas, de baixo peso molecular, com poucas possibilidades de fragmentação. Muitas vezes, as transições mais específicas não são as mais intensas, o que torna mais interessante e complexo o trabalho com sistemas LC-MS/MS. Nesses casos, outros experimentos devem ser utilizados em conjunto para confirmação dos analitos de interesse. Por exemplo, glucuronídeos eliminam o fragmento neutro m/z 176 Da, referente à porção ácido glucurônico da molécula. No trabalho de Fabregat et al.⁵⁴, os autores utilizaram experimento de perda neutra para confirmar se havia metabólitos da testosterona na forma de

glucuronídeos presentes na urina, mesmo após a hidrólise com β -glucuronidase. Com isso, identificaram dois glucuronídeos que são resistentes à hidrólise e que poderiam ser subestimados, de acordo com o método de quantificação utilizado.

Dependendo do objetivo, o analisador do tipo IT passa a ser mais vantajoso que o triplo quadrupolo. Isto se deve ao seu mecanismo de funcionamento que permite experimentos do tipo MS^n , ou seja, isolamento e fragmentação de íons em sequência, em um mesmo compartimento. Este processo, separado somente pelo tempo (*tandem* no tempo), gera espectros de massa que fornecem diversas informações sobre a estrutura do íon-precursor. No entanto, este analisador não realiza experimentos de *precursor ion scan* e *neutral loss*. Os experimentos realizados pelo analisador IT estão representados na FIGURA 1.7 a seguir.^{55,56}

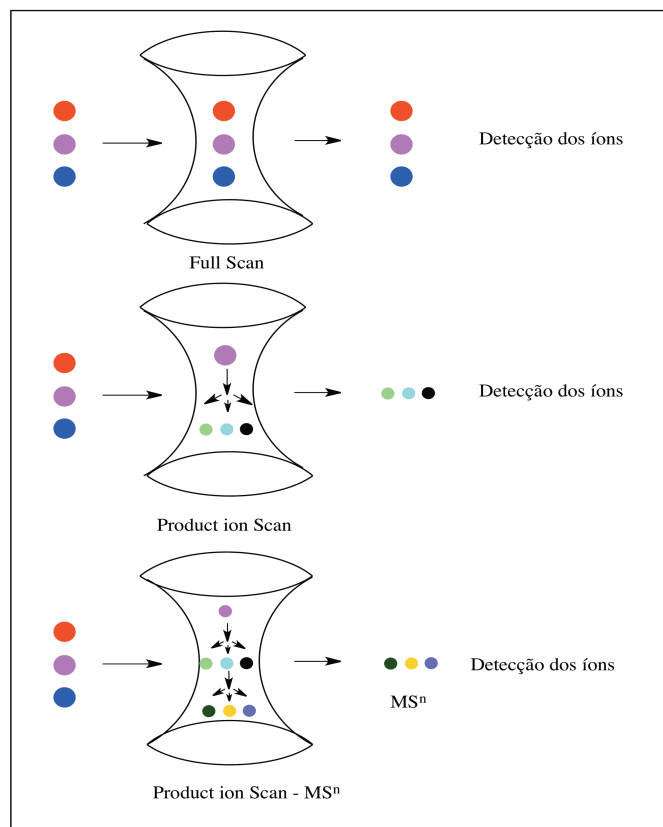


FIGURA 1. 7: Experimentos realizados no IT

Um analisador que consegue unir as vantagens do QqQ e do IT é o híbrido QTrap, sendo possível a realização de experimentos como *full MS scan*, *precursor ion scan*, *product ion scan* e *neutral loss* e também experimentos de MSⁿ. Assim, se ganha em sensibilidade e em espectros de massa com mais informações estruturais, tornando este analisador útil tanto para elucidação estrutural quanto para quantificação de compostos presentes em matrizes complexas.^{57,58}

É importante destacar que, mesmo com sistemas LC-MS/MS sensíveis e seletivos, como os disponíveis atualmente, não se deve negligenciar o preparo de amostra.⁵⁹ Deve-se avaliar o efeito de matriz (ME), a eficiência do processo (EP) e a recuperação (RE) no desenvolvimento de um método analítico. Estes parâmetros podem influenciar na linearidade, precisão e exatidão do método desenvolvido, levando à quantificação errônea. O mecanismo que rege o ME ainda não foi totalmente estabelecido, porém o mais aceito é a ocorrência de uma competição entre o analito e interferentes presentes na matriz, durante o processo de ionização, o que pode culminar com o aumento ou a supressão do sinal do analito no sistema LC-MS/MS. Este efeito é pronunciado quando se utilizam fontes de ionização API, e esforços devem ser empenhados para minimizar o ME.⁶⁰ O ME pode ser estimado comparando-se as áreas das bandas de um lote de padrão preparado em solvente em relação a um lote de matriz fortificada com padrão após o pré-tratamento da amostra, ambos na mesma concentração⁶¹, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{ME (\%)} = \text{B/A} \times 100$$

B = matriz fortificada após pré-tratamento

A = padrão em solvente

Quando o valor obtido para ME (%) for > 100 , significa que houve aumento do sinal do analito e, quando o valor de ME (%) for < 100 , indica supressão do sinal do analito. A recuperação é avaliada comparando-se as áreas de um lote de matriz fortificada com padrão antes do pré-tratamento com um lote de matriz fortificada após pré-tratamento⁶¹.

$$RE (\%) = C/B \times 100$$

B = matriz fortificada após pré-tratamento

C = matriz fortificada antes do pré-tratamento

Por fim, a eficiência do processo é a relação das áreas de um lote de matriz fortificada com padrão antes do pré-tratamento com um lote de padrão preparado em solvente⁶¹.

$$EP (\%) = C/A \times 100$$

C = matriz fortificada antes do pré-tratamento

A = padrão em solvente

Na FIGURA 1.8, observa-se um esquema demonstrando o procedimento para avaliar o ME, RE e EP.

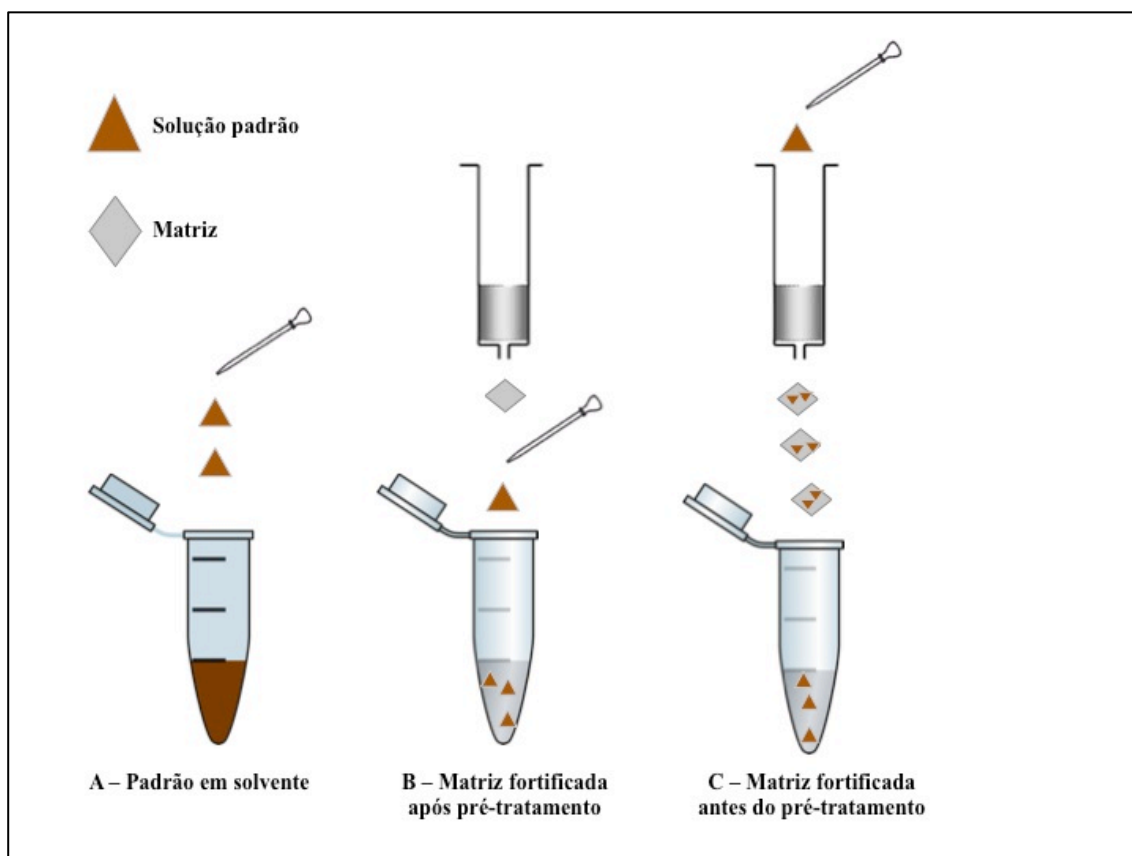


FIGURA 1. 8: Protocolo para avaliação de ME, RE e EP adaptado de Trufelli et al.⁶¹

No entanto, vale ressaltar que essa avaliação proposta por Trufelli et al.⁶¹ não se aplica a métodos por extração *on-line*. Até o ano de 2011, não havia nenhuma guia de validação com recomendações sobre a avaliação do efeito de matriz em métodos *on-line* até que a *European Medicines Agency* (EMA)⁶² publicou um protocolo. De acordo com a EMA, seis lotes de matriz devem ser avaliados, fortificando-se as amostras nos níveis baixo e alto de concentração em relação ao limite de quantificação do método. A variabilidade de resposta entre os lotes, para cada concentração, não deve passar de 15% para ser aceitável. No entanto, no protocolo da EMA, não há recomendação sobre como avaliar a recuperação em métodos por extração *on-line* da matriz. Assim, os estudos da exclusão das macromoléculas da matriz e transferência dos analitos para a segunda dimensão devem ser rigorosamente avaliados.

1.3. Preparo de amostra

O preparo de amostra é uma etapa-chave no desenvolvimento de um método bioanalítico, o qual precisa ser confiável, rápido e eficiente. Nesta etapa, que representa 75-80% do tempo total empregado no método, procura-se a exclusão ou eliminação de interferentes presentes na matriz, podendo ainda possibilitar uma pré-concentração dos analitos de interesse.⁶³⁻⁶⁵

Entre as técnicas mais comumente utilizadas no preparo de amostra, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a precipitação de proteínas (PP) e a extração em fase sólida (SPE).^{63,66,67} Estas técnicas estão bem estabelecidas na literatura e são largamente empregadas. No entanto, possuem diversas desvantagens, em especial, alta demanda de tempo.^{63,66-69} Técnicas modernas de preparo de amostra são rápidas, convenientes e, quando necessário, devem empregar quantidade mínima de solvente, cenário esse que se engaja no conceito de química verde.⁷⁰ Um dos principais objetivos da química verde é o emprego de métodos analíticos mais seguros, tanto em relação ao analista quanto ao meio ambiente, e que ainda produzam resíduos menos tóxicos. Esta meta pode ser alcançada por meio do desenvolvimento de novos procedimentos analíticos ou, simplesmente, pela adaptação de um método convencional, de forma a incorporar etapas que demandem materiais menos perigosos ou, ao menos, utilizem menores quantidades destes, por meio de técnicas *on-line* e/ou miniaturizadas.⁷¹⁻⁷³

Nesse sentido, técnicas de injeção direta de amostra ou ainda técnicas que minimizem seu preparo têm sido exploradas, uma vez que diminuem os erros de manipulação inerentes ao analista, e a perda dos analitos durante as etapas de manipulação, promovem a economia de

solventes, minimizam o manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumentam significativamente o número de análises por unidade de tempo. Dentre essas técnicas, destacam-se a cromatografia de fluxo turbulento (TFC, *turbulent flow chromatography*), a microextração em fase sólida no capilar (*in tube*-SPME), os polímeros com capacidade de reconhecimento molecular (MIP, *molecularly-imprinted polymers*) e as colunas de meio de acesso restrito (RAM).^{49,74}

Na cromatografia de fluxo turbulento, empregam-se colunas com diâmetro interno reduzido (0,5; 1,0 ou 2,1 mm) empacotadas com partículas na ordem de 20-60 µm. Estas colunas são eluídas sob alta vazão (maior que 1,2 mL/min) e, devido ao grande espaço intersticial entre as partículas da fase estacionária e a alta velocidade da fase móvel, é gerado um fluxo turbulento. Com isso, as macromoléculas, como proteínas e lipídeos, são eluídas no volume morto da coluna, pois não há tempo hábil para interagirem com a fase estacionária. Já as pequenas moléculas ficam retidas, pois conseguem se difundir para o poro da fase estacionária.^{49,66,75,76} Após o término da eluição das macromoléculas, os analitos retidos na coluna de TFC são eluídos e transferidos para a coluna cromatográfica.⁷⁵ Esta técnica é eficiente e demanda baixo tempo de análise, no entanto, algumas desvantagens podem ser destacadas, como, por exemplo, a ocorrência de efeito memória e a baixa vida útil das colunas de TFC que se mantêm reprodutíveis por até 500 injeções, em média, dependendo das condições em uso.^{49,75}

A *in tube*-SPME é uma alternativa no preparo de amostras *on-line*. Nesta técnica utiliza-se um capilar de sílica fundida, revestido internamente com uma fase estacionária quimicamente ligada. A automação se dá pela fixação do capilar entre a alça de amostragem e a agulha do autoinjeter do sistema HPLC. O autoinjeter aspira a amostra do

frasco e transporta-a para o capilar a uma velocidade linear constante e, posteriormente, este volume é dispensado novamente no frasco. Esses ciclos aspirar/dispensar são executados repetidamente e, durante este processo, ocorre partição ou sorção do analito com a fase estacionária, até que o equilíbrio seja atingido. Os analitos extraídos são dessorvidos do capilar pela percolação da fase móvel ou pela adição de um pequeno volume de solvente orgânico, após posicionar a válvula do injetor HPLC na posição injetar. Os analitos dessorvidos são transferidos para a coluna analítica do HPLC, para separação e posterior detecção.^{49,64,77,78} Um capilar pode ser reutilizado na injeção de 500 amostras, em média, sem ser deteriorado. Essa técnica, embora apresente vantagens interessantes, como, por exemplo, o baixo custo, apresenta uma grande desvantagem que é a necessidade de amostras “limpas”, pré-filtradas e centrifugadas, visto que amostras complexas podem causar o entupimento do capilar.^{70,79}

Colunas empacotadas com polímeros molecularmente impressos (MIP) são ferramentas de preparo de amostra *on-line* altamente seletivas. Uma rede polimérica é criada ao redor da molécula-alvo (modelo) e, após sua polimerização, este modelo é removido e fica impressa no retículo polimérico uma cavidade capaz de reter o analito de interesse ou moléculas de uma mesma classe por afinidade química e estérica por meio de extração seletiva da matriz.^{65,67,71,74,75} No entanto, a alta seletividade do MIP pode tornar-se um inconveniente, pois dificulta sua comercialização, já que estes são específicos, e o seu preparo envolve alto custo. Outra dificuldade inerente aos MIPs está relacionada à dificuldade em eluir o analito retido na cavidade polimérica, o qual pode ficar fortemente ligado e resultar em métodos pouco reprodutíveis.⁷⁹

As fases do tipo RAM são materiais biocompatíveis e permitem a injeção direta de matrizes complexas, pois são capazes de

fracionar a amostra biológica, separando as macromoléculas do analito de interesse. As macromoléculas são impedidas de entrar em contato com o interior da fase estacionária devido ao seu tamanho, maior que o poro do suporte. Ainda, devido à superfície externa do suporte ser altamente hidrofílica, as macromoléculas não interagem com o mesmo e são eluídas no volume morto da coluna. Já as pequenas moléculas acessam o interior do suporte e ficam retidas por interações hidrofóbicas, de troca iônica (IEX) ou afinidade.

A FIGURA 1.9 representa a exclusão de proteínas e a retenção das pequenas moléculas nas colunas RAM.

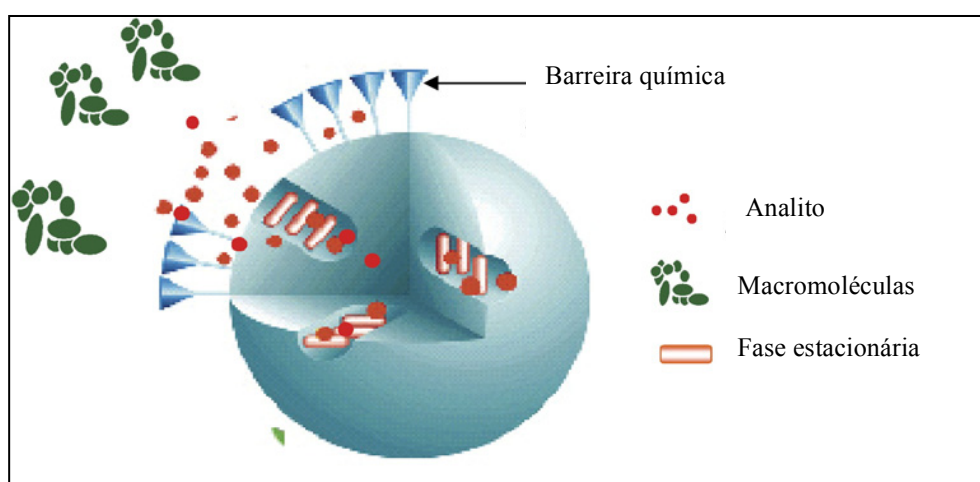


FIGURA 1. 9: Exclusão das proteínas e retenção das pequenas moléculas na fase hidrofóbica da coluna RAM. Adaptado de Mullett, W.⁷⁰

Em 1985, Hagestam e Pinkerton⁸⁰ introduziram o primeiro suporte cromatográfico que permite injeção direta de biofluido, denominado *internal surface reversed-phase* (ISRP). Somente em 1991, o termo meio de acesso restrito (*restricted access material* – RAM) foi introduzido por Desilets et al.⁸¹ As fases do tipo RAM podem realizar a exclusão das macromoléculas por barreiras de difusão químicas ou físicas. Estas fases também são classificadas de acordo com a topoquímica da

superfície quimicamente ligada. Bimodais são as fases que apresentam propriedades diferentes na superfície externa e no interior do poro do suporte e unimodal são aquelas com propriedades iguais, externa e internamente.⁸²

Existem diversas fases do tipo RAM, como, por exemplo, as *Internal Surface Reversed-Phase* - ISRP⁸⁰, *Semi-Permeable Surface* - SPS⁸¹, *Shielded Hydrophobic Phases* - SHP⁸³, *Alkyl-Diol Sílica* - ADS⁸⁴, *mixed-functional-phase* - MFP⁸⁵ e ainda as fases com proteína imobilizada.⁸⁶

As colunas RAM bimodais de proteína imobilizadas foram desenvolvidas inicialmente por Yoshida et al.⁸⁶, em 1984, através do preparo de uma fase estacionária C₁₈ com os sítios de adsorção externos saturados com a proteína α -1-ácido glicoproteico (AGP) desnaturada.

Na sequência, Menezes e Felix⁸⁷⁻⁸⁹ reportaram o preparo de coluna RAM por meio do recobrimento do suporte C₁₈ com albumina sérica bovina (BSA) ou humana (HSA) por cromatografia frontal, sendo a estabilidade promovida pelo entrecruzamento com glutaraldeído. Diversos suportes cromatográficos foram recobertos com BSA ou HSA, como fases C₈, fenil-hexil, ciano, SAX, SCX e suportes quirais, como β -ciclodextrina.^{82,88,90} As colunas RAM-BSA têm sido largamente empregadas neste grupo de pesquisa frente a diversas matrizes complexas, tais como plasma^{82,91,92}, leite bovino⁹³⁻⁹⁶, leite materno⁹⁷, ovo⁹⁸, amostras ambientais^{99,100} e urina¹⁰¹.

As fases do tipo RAM são bastante versáteis e podem ser utilizadas no modo simples de análise e no modo multidimensional. No primeiro modo, a coluna RAM funciona como coluna extratora e coluna analítica, uma vez que a matriz é injetada diretamente na coluna RAM e, após exclusão das macromoléculas, os compostos de interesse são

analisados. Na cromatografia multidimensional (FIGURA 1.10), a coluna RAM é usada somente como coluna extratora e, após a exclusão das macromoléculas, os analitos são transferidos para uma coluna analítica, utilizando-se uma válvula de comutação, onde são separados e analisados.¹⁰²

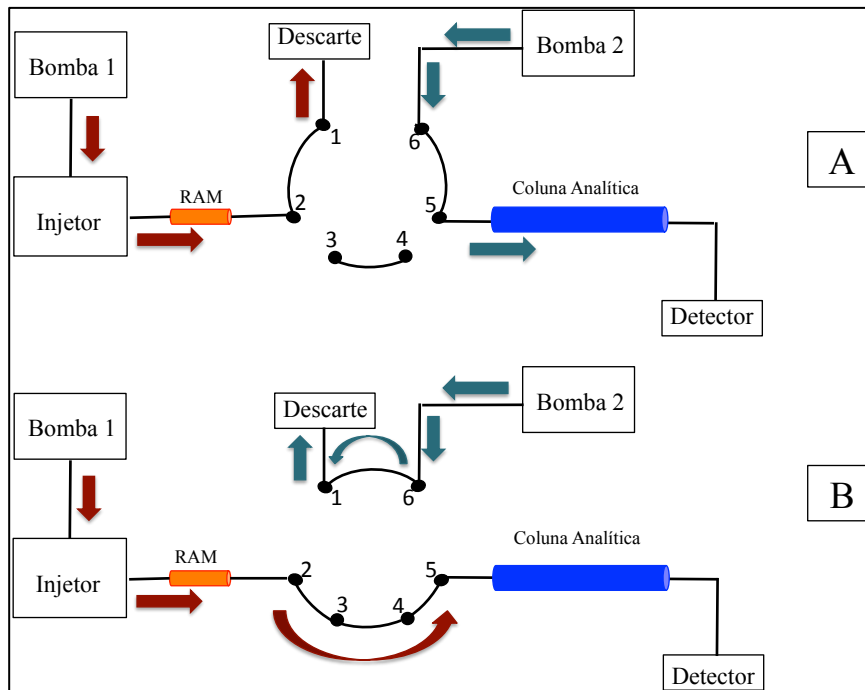


FIGURA 1. 10: Sistema multidimensional; A: exclusão das macromoléculas e condicionamento da coluna analítica; B: Acoplamento entre as colunas

1.4. Colunas RAM e a matriz urina

As colunas RAM têm sido largamente empregadas na análise de diversos compostos em urina. Na TABELA 1.2, estão descritos alguns exemplos. Vale ressaltar que, apenas nos estudos 1 e 3, os conjugados glucuronídeos e sulfatos presentes na urina foram previamente hidrolisados para posterior quantificação das agliconas.

TABELA 1. 2: Emprego de colunas RAM na análise de compostos na matriz urina – adaptado da referência⁴⁹

Estudo	Analito	Coluna RAM	Sistema LC-MS	Ref.
1	Triclocarbano e seus metabólitos	LiChrospher [®] RP-18 ADS	Q-Trap-MS/MS	103
2	Nucleosídeos e nucleobases	MSpak [™] PK-4A	QqQ-Ms/MS	104
3	Bisfenol A e bisfenol A catecol	LiChrospher [®] RP-18 ADS	Q-Trap-MS/MS	105
4	Metabólitos de estireno	LiChrospher [®] RP-18 ADS	QqQ-Ms/MS	106
5	Clorotoluron CMPU diuron 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia 1-naftol, 1-hidroxinaftaleno bisfenol A e bisfenol F bis-(4-hidroxifenil)-metano triclorofenol 2,4,5triclorofenol, 2,4,5-triclorofenoxi-ácido acético 2-(2,4,5-triclorofenoxi)-ácido propiônico	LiChrospher [®] RP-4 ADS	IT-MS/MS	107

continua a seguir

TABELA 1. 2: Emprego de colunas RAM na análise de compostos na matriz urina – adaptado da referência⁴⁹ *continuação*

6	Abacavir, nevirapina e indinavir	Hisep	Q-Trap-MS/MS	108
7	Biomarcadores de acrilonitrila e 1,3-butadieno	LiChrospher [®] RP-8 ADS	QqQ-Ms/MS	109
8	Ácido-s-fenilmercaptúrico e ácido-s-benzilmercaptúrico	LiChrospher [®] RP-8 ADS	QqQ-Ms/MS	110
9	Estrógenos	Shim-pack [®] MAYI-ODS	Q-MS	111
10	Antidepressivos	Empacotada em capilar de sílica fundida com LiChrospher [®] ADS-C18 e LiChrospher [®] XDS	QqQ-Ms/MS	112

Dentre as colunas do tipo RAM comerciais, a ADS é a mais utilizada. As colunas RAM miniaturizadas também foram desenvolvidas e avaliadas na análise de fármacos em plasma e em urina e apresentaram alta eficiência na exclusão de macromoléculas e também em relação ao efeito de matriz, comumente apresentado quando se utilizam sistemas LC-MS/MS.¹¹² Colunas RAM de troca iônica também foram preparadas e avaliadas frente à análise de fármacos com caráter ácido em plasma e em urina.¹¹³ Embora as colunas RAM tenham demonstrado alta eficiência no *clean-up* de urina na análise de diversos compostos, ainda não foram aplicadas na análise de glucuronídeos presentes na urina. Na literatura, encontrou-se apenas um relato do emprego de coluna RAM na análise de glucuronídeo, porém a matriz avaliada foi plasma¹¹⁴.

1.5. Glucuronídeos selecionados para o estudo

Neste trabalho, para desenvolver métodos para análise de glucuronídeo em urina humana utilizando-se colunas RAM-BSA para injeção direta de amostras, selecionou-se o glucuronídeo do fenol (fenil- β -D-glucuronídeo) e do nitrofenol (nitrofenil- β -D-glucuronídeo) como modelo.

O fenil- β -D-glucuronídeo (FIGURA 1.11) é um dos metabólitos de excreção do fenol e, conseqüentemente, do benzeno¹¹⁵. Este glucuronídeo é excretado na urina e pode ser utilizado como biomarcador, tanto para exposição ao fenol quanto para o benzeno. Já o nitrofenil- β -D-glucuronídeo (FIGURA 1.11) é um metabólito do nitrobenzeno e do nitrofenol. O nitrobenzeno é largamente utilizado na síntese de diversas substâncias químicas, sendo a anilina uma das mais importantes, já que é empregada na produção de poliuretano. Portanto, o estudo do glucuronídeo do nitrobenzeno também é relevante, pois este pode ser utilizado como biomarcador para anilina e também do próprio nitrobenzeno e nitrofenol¹¹⁶.

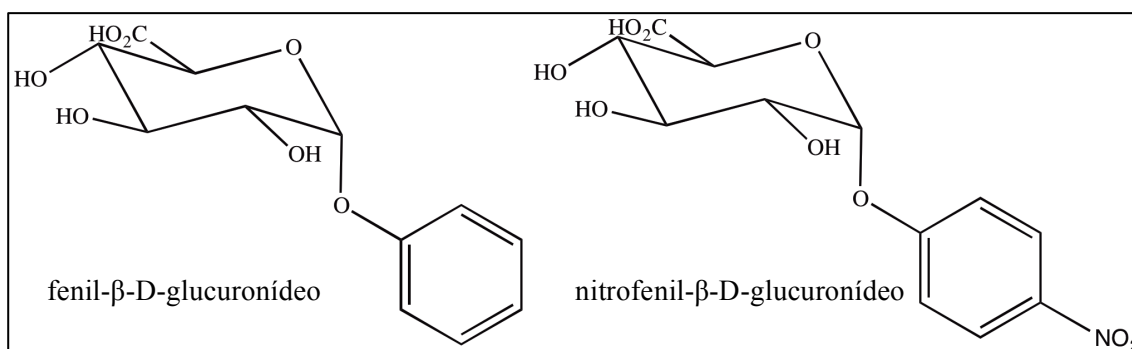


FIGURA 1. 11: Glucuronídeos selecionados para o estudo

OBJETIVOS

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a quantificação de glucuronídeos em urina humana, utilizando-se colunas de meio de acesso restrito com albumina sérica bovina (RAM-BSA) imobilizada para injeção direta de amostra.

Assim, os objetivos específicos consistiram em:

- Preparo e avaliação das colunas RAM-BSA SAX e C₈, em relação à exclusão das macromoléculas da urina;
- Estudo da retenção do fenil-β-D-glucoronídeo nas colunas RAM-BSA preparadas;
- Desenvolvimento e validação de métodos para quantificar glucuronídeos em urina por LC-MS/MS.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. Procedimento Experimental

3.1. Generalidades

As análises cromatográficas foram realizadas nos seguintes sistemas:

1 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por duas bombas LC 10-ATvp, válvula seletora de solvente FCV-10ALvp, degaseificador de membrana DGU-14A, detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD-10Avp, autoinjeter SIL10-ADvp, forno CTO-10Svp e válvula de três caminhos Valco Nitronic 7000, para o acoplamento das colunas. O equipamento apresentava-se acoplado a uma interface SCL-10Avp, e os cromatogramas foram registrados através do *software* Class-Vp.

2 - Cromatógrafo líquido de ultraperformance Waters Acquity (Milford, USA), composto por duas bombas, sendo uma binária e outra quaternária, com injetor automático Waters 2777C e sistemas de válvulas comutadoras de seis caminhos, configuradas para extração *on-line* (1 válvula Valco® VICI para a injeção e 2 válvulas Everflow® para acoplamento em duas dimensões), acoplado a um analisador de massa Xevo TQ-MS (Waters, Milford, USA) com fonte de ionização à pressão atmosférica do tipo *electrospray* (ESI), operando no modo negativo. Os cromatogramas e espectros de massa foram registrados através do *software* Mass-Lynx.

3 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por duas bombas LC-20AD com uma válvula

comutadora de seis caminhos Valco NITronic 7000, degaseificador de membrana DGU-20A5 e autoinjeter SIL-20A. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa modelo Esquire 6000 *ion trap* (IT) (Bruker Daltonics, Germany) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo negativo. A aquisição de dados foi realizada utilizando-se o *software* Data Analysis.

As colunas não comerciais foram empacotadas utilizando-se empacotadora Shandon.

As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R.

A água utilizada na composição das fases móveis e na preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q *Gradient* Millipore (Millipore, São Paulo, Brasil).

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram todos grau HPLC adquiridos da Mallinckrodt Baker (St. Louis, EUA). O padrão de fenil- β -D-glucuronídeo (FG) foi obtido da Acros Organics (New Jersey, USA) e o de nitrofenil- β -D-glucuronídeo (NFG) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os demais reagentes utilizados foram obtidos de diversas fontes: Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanha), Acros (St. Louis, EUA) e Synth (Diadema, SP, Brasil).

A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex PHOENIX AP56.

Para a pesagem dos reagentes, foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo AL 204 com precisão 0,0001g.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, Qualxtron, modelo 8010, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH,

conectado a um eletrodo de vidro combinado. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções-tampão pH 4,00 e 7,00 (Chemis).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca Eppendorf, modelo Xplorer.

As soluções-estoques foram preparadas em água purificada e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um *pool* de seis urinas foi utilizado nos estudos, sendo composto por três urinas de doadores do sexo feminino e três de doadores do sexo masculino.

O uso de urina humana foi aprovado pelo Comitê de Ética Humano da UFSCar (parecer em anexo). As urinas foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi, situado na cidade de São Carlos. As dosagens de creatinina nas amostras foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi utilizando-se o método cinético da reação de Jaffé¹¹⁷.

A urina artificial utilizada foi a Urisub[®] da marca CST Technologies, Inc. Trata-se de uma solução salina com características físico-químicas semelhantes à urina humana, porém isenta de compostos endógenos.

Neste trabalho, urina humana branca ou urina artificial branca compreendem urinas livres de FG e/ou NFG. As urinas foram centrifugadas por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e o sobrenadante foi utilizado no preparo das amostras.

Todas as proporções expressas em porcentagem (%) neste trabalho se referem à mistura volume/volume (v/v).

3.2. Preparo e avaliação das colunas RAM-BSA

As sílicas utilizadas para o empacotamento das colunas foram: sílica modificada amônia quaternária (SAX) Nucleosil[®] SB (100Å, 5mm),

fornecida pela Macherey-Nagel e octilsílica (C₈) Luna[®] (100Å, 10mm), fornecida pela Phenomenex.

As colunas foram preparadas em tubos de aço inoxidável (50,0 x 2,1 mm). Preparou-se uma suspensão de 0,3 g de sílica em 50 mL de metanol, a qual foi homogeneizada por ultrassom durante 3 min. Posteriormente, os tubos de aço foram preenchidos sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. Após empacotamento, as colunas foram condicionadas em metanol sob vazão de 0,5 mL/min, durante 12 horas.

Para o preparo das colunas de meio de acesso restrito, seguiu-se procedimento estabelecido no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar⁹³, adaptado do protocolo proposto por Menezes e Felix⁸⁸.

Após o condicionamento das colunas, eluiu-se uma solução-tampão de KH₂PO₄ (50 mM; pH 6,0) a uma vazão de 1,0 mL/min durante 40 min. Em seguida, uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 2,0 mg/mL (preparada em solução-tampão KH₂PO₄ 50 mM pH 6,0) foi eluída pela coluna, durante 50 min. Posteriormente, percolou-se pela coluna água deionizada durante 40 min. Logo em seguida, eluíram-se duas frações de 10 mL de glutaraldeído a 25%, promovendo o intercruzamento com a BSA. Após repouso de 12 horas a 4 °C, uma solução de boro-hidreto de sódio 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até a obtenção de um eluato pH 10. Após 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água deionizada por 1 hora. As colunas preparadas foram mantidas em água e armazenadas a 4 °C. Para a realização desse procedimento, utilizou-se uma bomba LC-10AD conectada por uma controladora CBM-10A, ambas Shimadzu (kyoto, Japão).

Para avaliar a exclusão das macromoléculas da urina, uma alíquota de 1 mL do *pool* de urina humana (sem diluição) foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 15 min, a 4 °C. Após condicionamento da coluna RAM-BSA com o eluente selecionado, 50 µL do sobrenadante do *pool* de urina humana (sem diluição) foram injetados no sistema cromatográfico, a uma vazão de 0,5 mL/min, sendo monitorado o comprimento de onda de 254 nm. A fase móvel selecionada foi a que proporcionou menor tempo de exclusão das macromoléculas.

Para o estudo da retenção do FG nas colunas RAM-BSA, analisou-se solução-padrão de FG em água (180 µg/mL) no sistema cromatográfico 1 descrito no item 3.1. Diferentes fases móveis foram avaliadas na vazão de 0,5 mL/min, sendo o comprimento de onda monitorado 254 nm.

3.3. Quantificação de fenil-β-D-glucuronídeo (FG) em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS

3.3.1. Condições analíticas avaliadas no sistema UHPLC-QqQ para quantificação de FG

A coluna RAM-BSA C₈ foi utilizada, na primeira dimensão do sistema 2D, para realizar a exclusão das macromoléculas, presentes na urina humana, e a pré-concentração dos analitos. Na segunda dimensão, foram avaliadas as colunas C₈ Luna® Phenomenex, *home made* (150 x 2,1, 10 µm) e Waters Acquity UPLC BEH Fenil (100 x 2,1, 1,7 µm).

Acoplamento RAM-BSA C₈ - C₈

Para a otimização das condições de ionização, a solução aquosa de FG (1 µg/mL) foi introduzida por infusão no sistema no modo *combined* a uma vazão de 20 µL/min, combinada com a vazão de 200 µL/min de solução aquosa contendo 0,1% ácido fórmico/ACN 40:60 v/v vinda do sistema cromatográfico. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 2 kV, voltagem do cone: 23 V, temperatura de dessolvatação: 500 °C, vazão do gás de dessolvatação: 1000 L/hr. A energia de colisão (CE), para cada transição, foi otimizada através do *software* MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart. O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM), e as seguintes transições foram selecionadas para monitoramento: 269,1 → 92,6 (CE = 33 eV) e 269,1 → 113 (CE = 11 eV).

As condições analíticas consistiram em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, utilizando-se como fase móvel água/ACN 99:1 (v/v);

4,01-6,20 min: eluição e transferência do FG, utilizando-se como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 70:30 (v/v);

4,30-6,20 min: acoplamento entre as colunas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 70:30 (v/v);

6,20-10,0 min: análise do FG na coluna analítica C₈, utilizando-se como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e solução de ACN contendo 0,1% de ácido fórmico na proporção 70:30 (v/v).

6,20-10,0 min: condicionamento da coluna RAM-BSA C₈ com água/ACN 99:1 (v/v).

A vazão utilizada, em ambas as dimensões, foi de 0,5 mL/min, e o volume de injeção foi de 10 µL.

Acoplamento RAM-BSA C₈ - Acquity UPLC BEH Fenil

As condições de ionização e as transições monitoradas foram as mesmas descritas no item 3.3.1 - *acoplamento RAM-BSA C₈ x C₈*.

As condições analíticas consistiram em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 99:1 (v/v);

4,01-6,10 min: eluição do FG, utilizando-se solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 70:30 (v/v);

6,10-7,10,0 min: acoplamento entre as colunas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 70:30 (v/v);

6,00-10,0 min: análise do FG na coluna analítica Acquity UPLC BEH Fenil, utilizando-se solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 70:30 (v/v)

6,00-10,0 min: condicionamento da coluna RAM-BSA com solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 99:1 (v/v);

A vazão utilizada em ambas as dimensões foi de 0,3 mL/min, e o volume de injeção, 10 µL.

Preparo de soluções e amostras

Soluções de FG em água

Preparou-se solução-estoque de FG (100 µg/mL) em água. Para a solução-padrão de FG a 500 ng/mL, 10 µL da solução-estoque foram aliqüotados e transferidos para balão volumétrico de 2 mL, completando-se o volume com água.

Para a solução-padrão de NFG (130 ng/mL), preparou-se solução-estoque intermediária 13 µg/mL a partir do estoque (100 µg/mL), aliqüotando-se 1300 µL da mesma e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL, avolumando-se com água. Para preparar a solução de trabalho, 10 µL da solução-estoque intermediária (13 µg/mL) foram aliqüotados e transferidos para balão volumétrico de 1 mL, completando-se o volume com água .

Amostra de urina branca diluída

Para a diluição 1:1 v/v da urina branca, 500 µL do *pool* (n=6) de urina foram aliqüotados e transferidos para um eppendorf contendo 500 µL de água. Após homogeneização da amostra, centrifugou-se a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para o vial e analisado. Este mesmo procedimento foi adotado para diluição da urina artificial.

3.3.2. Desenvolvimento de método para quantificação de FG por LC-IT-MS/MS

Para otimização das condições de ionização, realizou-se infusão de uma solução aquosa de FG (1 µg/mL) diretamente na fonte de ionização com auxílio de uma bomba-seringa. Os parâmetros de ionização foram otimizados no modo *expert tune* do *software* Daltonics Esquire. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 4,64 kV, pressão de nebulização 30,0 psi, temperatura de dessolvatação 325 °C, vazão do gás de dessolvatação 900 L/hr, amplitude de fragmentação 1,00 V, *target* 50000 e *max. accu. time* 200 ms. O espectrômetro de massa operou no modo de monitoramento de íons-produtos, sendo o íon molecular desprotonado isolado e fragmentado e os íons-produtos monitorados. Para quantificação, monitorou-se o íon-produto m/z 113 e para confirmação monitorou-se a razão entre os íons m/z 175 e m/z 113.

O sistema 3 (item 3.1.) utilizado nesse método foi configurado no modo multidimensional, sendo a coluna RAM-BSA C₈ acoplada à coluna Ascentis Express F5. O método analítico consistiu em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico;

4,01-9,80 min: eluição do FG da coluna RAM-BSA, utilizando-se formiato de amônio 10 mM pH 2,0/MeOH 50:50 (v/v);

8,30-9,80 min: acoplamento entre as colunas, utilizando-se como fase móvel formiato de amônio 10 mM pH 2,0/MeOH 50:50 (v/v);

9,80-17,0 min: análise do FG na coluna analítica com metanol/formiato de amônio 10 mM pH 2,0 60:40 (v/v);

9,80-17,0 min: acondicionamento da coluna RAM-BSA com solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico.

A vazão utilizada em ambas as dimensões foi de 0,2 mL/min, e o volume de injeção, 20 µL.

Preparo das soluções de trabalho

Uma solução-estoque de FG (10 mg/mL) foi preparada em água. A partir da diluição da solução 10 mg/mL, uma solução-estoque intermediária foi preparada em água na concentração de 1 mg/mL. A partir da solução-estoque intermediária, prepararam-se soluções de trabalho em água na concentração de 40,0, 80,0, 120, 160, 200, 280, 360, 440 e 560 µg/mL. As soluções-padrão de calibração foram preparadas nas seguintes concentrações: 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 7,00; 9,00; 11,0 e 13,0 µg/mL.

Para definição das concentrações das soluções de controle de qualidade (CQ), foram utilizados os critérios estabelecidos pelos guias internacionais de validação de métodos bioanalíticos, sendo que o CQB deve estar entre 110-120% da concentração mais baixa da curva de calibração, o CQM deve estar entre 40-60% da concentração mais alta da curva de calibração, e o CQA deve estar entre 75-95% da concentração mais alta da curva de calibração. As soluções de trabalho nas concentrações de 140, 240 e 320 µg/mL foram preparadas a partir da solução-estoque intermediária de 1 mg/mL de FG. As concentrações estabelecidas para o CQB, CQM e CQA foram 3,50; 6,00 e 8,00 µg/mL, respectivamente. Todas as soluções foram mantidas a -20 °C.

Preparo das amostras

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata, a partir das soluções de trabalho em água nas concentrações de 40,0, 80,0, 120, 160, 200, 280, 360, 440 e 560 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma destas soluções 5 μL foram aliqüotados e transferidos para eppendorf contendo 95 μL do sobrenadante do *pool* (n=6) de urina centrifugado, 95 μL de água e 5 μL de ácido fórmico, obtendo-se soluções de calibração nas concentrações de 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 7,00; 9,00; 11,0 e 13,0 $\mu\text{g/mL}$, as quais foram transferidas para vial e analisadas no sistema LC-MS.

As amostras de controle de qualidade foram preparadas em quintuplicata, a partir das soluções de trabalho em água nas concentrações de 140, 240 e 320 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma destas soluções, 5 μL foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 95 μL do sobrenadante do *pool* (n=6) de urina centrifugado, 95 μL de água e 5 μL de ácido fórmico e obtendo-se soluções na concentração de 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 7,00; 9,00; 11,0 e 13,0 $\mu\text{g/mL}$, as quais foram transferidas para vial e analisadas no sistema LC-MS.

Validação do método

A seletividade do método foi avaliada através da análise da amostra de três urinas de doadores do sexo masculino e três do sexo feminino, sem adição do analito.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), não excedeu o valor de 20% do valor nominal da concentração. O limite de

detecção (LD) foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

A estabilidade de autoinjeter também foi avaliada, seguindo os critérios anteriormente descritos, porém a amostra foi avaliada após 24 horas (t24) de armazenamento à temperatura ambiente. A exatidão do t0 foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação à curva média. Já a exatidão do lote t24 foi calculada a partir da interpolação das áreas em relação a uma curva recém-preparada e injetada imediatamente anterior ao respectivo lote.

Em relação à estabilidade após ciclo de degelo, um lote de controle foi preparado e analisado imediatamente (Dt0). Na sequência, este foi congelado por 48 hrs (Dt48), degelado e analisado. A exatidão foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação a uma curva recém-preparada e injetada imediatamente anterior ao lote Dt0.

O efeito de matriz (EM) foi avaliado qualitativamente e quantitativamente. O EM qualitativo foi avaliado por meio de infusão pós-coluna do FG em água na concentração de 6 µg/mL com o auxílio de uma bomba-seringa, na vazão de 10 µL/min. Concomitantemente, 20 µL da urina *pool*, urina artificial e a água foram injetadas individualmente no sistema de LC, passando pela coluna RAM-BSA C₈, nas condições cromatográficas estabelecidas.

O EM quantitativo foi avaliado por extração *on-line*, seguindo-se as diretrizes descritas no guia de validação publicado pela EMA. Para tanto, seis amostras de urina de indivíduos diferentes, sendo estes três mulheres e três homens, foram fortificadas nas concentrações estabelecidas para os controles de qualidade baixo e alto. O efeito de matriz foi calculado por meio do coeficiente de variação entre todas as amostras injetadas e

também entre o grupo de homens e mulheres, segundo critério preconizado pela *European Medicines Agency* (EMA)⁶².

Aplicação do método

Para aplicação do método, avaliaram-se as urinas de oito indivíduos que se submeteram a exames clínicos para avaliar fenol urinário, as quais foram doadas pelo Laboratório Dr. Maricondi. Para tanto, uma curva de calibração foi preparada conforme descrito no preparo de amostra. As amostras de urina dos indivíduos doadores foram centrifugadas e 100 μL do sobrenadante foram transferidos para eppendorf contendo 95 μL de água e 5 μL de ácido fórmico. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para vial, analisadas e quantificadas por padronização externa.

Adição de padrão

Para construção da curva de calibração por adição de padrão, a partir de solução-estoque intermediária de FG em água na concentração de 1 mg/mL, prepararam-se soluções de trabalho nas concentrações de 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de 100 μL das urinas dos indivíduos 4, 5 e 6 foi transferida individualmente para eppendorf contendo 90 μL de água, 5 μL de ácido fórmico e 5 μL das soluções de trabalho, conforme concentração desejada. Para a amostra do indivíduo 6, antes de proceder à adição de padrão, realizou-se diluição alíquotando-se 10 μL da amostra e transferindo-se para eppendorf contendo 190 μL de água.

Uma amostra-padrão com o *pool* de urina na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada. Para isso, adicionaram-se em eppendorf 95 μL do sobrenadante do *pool* de urina pós-centrifugação, 95 μL de água, 5 μL da

solução de trabalho de FG na concentração de 80 µg/mL e 5 µL de ácido fórmico. As amostras preparadas foram injetadas no sistema LC-MS nas condições estabelecidas, e a curva de calibração foi construída, sendo a regressão linear o modelo matemático escolhido para representar o conjunto de dados. Igualando-se o valor de y a zero, obteve-se o valor de x que representa a concentração de FG adicionada a cada urina individual.

3.4. Quantificação de nitrofenil-β-D-glucuronídeo (NFG) em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS

3.4.1. Condições analíticas avaliadas no sistema UHPLC-QqQ para quantificação de NFG

Na primeira dimensão, utilizou-se a coluna RAM-BSA C₈ para a extração das macromoléculas e retenção do NFG. Na segunda dimensão, foram avaliadas as colunas Waters Acquity UPLC BEH Fenil (100 x 2,1, 1,7 µm) e a coluna ZIC[®]-HILIC Merck (150 x 2,1 mm, 5 µm).

Acoplamento RAM-BSA C₈ - Acquity UPLC BEH Fenil

Para a otimização das condições de ionização, solução aquosa de NFG (1 µg/mL) foi infundida no sistema no modo *combined* a uma vazão de 20 µL/min, combinada com a vazão de 200 µL/min de solução aquosa contendo 0,1% ácido fórmico/ACN 40:60 v/v vinda do sistema cromatográfico. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 2 kV, voltagem do cone: 18 V, temperatura de dessolvatação: 500 °C, vazão

do gás de dessolvatação: 1000 L/hr. A energia de colisão (CE) para cada transição foi otimizada através do software MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart. O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) e selecionaram-se as seguintes transições para monitoramento: 314,2 → 138 (CE = 24 eV) e 314,2 → 112,9 (CE = 14 eV).

As condições analíticas consistiram em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 99:1 (v/v);

5,01-7,00 min: eluição do NFG, utilizando-se solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico 30:70 (v/v);

6,10-7,00 min: acoplamento entre as colunas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico 30:70 (v/v);

6,10-15,0 min: análise do NFG na coluna analítica Acquity UPLC BEH Fenil, utilizando-se solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico 30:70 (v/v);

6,00-10,0 min: acondicionamento da coluna RAM-BSA com solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN 99:1 (v/v). A vazão utilizada em ambas as dimensões foi de 0,3 mL/min, e o volume de injeção, 10 µL.

Preparo de soluções e amostras

Solução de NFG preparada em água

Solução-estoque de NFG (100 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada em água. Para preparar a solução de trabalho a 500 ng/mL , 10 μL da solução-estoque (100 $\mu\text{g/mL}$) foram aliqüotados e transferidos para balão volumétrico de 2 mL, avolumando-se com água.

Para se obter a solução de trabalho de NFG na concentração de 130 ng/mL , preparou-se solução-estoque intermediária na concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$. Para tanto, 1.300 μL da solução-estoque (100 $\mu\text{g/mL}$) foram aliqüotados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, avolumando-se com água. Na sequência, 10 μL da solução-estoque intermediária (13 $\mu\text{g/mL}$) foram aliqüotados e transferidos para balão volumétrico de 1 mL, avolumando-se com água e obtendo-se a concentração final de NFG de 130 ng/mL .

Amostra de urina artificial fortificada com NFG na concentração de 130 ng/mL

Solução-estoque de NFG (100 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada em água. Preparou-se solução-estoque intermediária, aliqüotando-se 1.300 μL da solução-estoque (100 $\mu\text{g/mL}$) e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL, avolumando-se com água e obtendo-se a concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$. Para preparar a amostra, 10 μL da solução-estoque intermediária (13 $\mu\text{g/mL}$) foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 490 μL de urina artificial centrifugada e obtendo-se NFG na concentração de 260 ng/mL . Realizou-se a diluição da amostra, aliqüotando-se 500 μL ,

transferindo-se para balão volumétrico de 1 mL e completando-se volume com água, obtendo-se solução de NFG com concentração de 130 ng/mL.

Acoplamento RAM-BSA C₈ - ZIC-HILIC

As condições de ionização foram as mesmas descritas no item 3.4.1 - *Acoplamento RAM-BSA C₈ x Acquity UPLC BEH Fenil*. Para gerar o íon m/z 138 na fonte, elevou-se a energia do cone para 50 V. Para estabelecer as novas energias de colisão, utilizou-se o software MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart. O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM), e as transições monitoradas a partir do íon m/z 138 gerado na fonte foram: 138 → 92,0 (CE = 20 eV) e 138 → 108 (CE = 15 eV).

As condições analíticas consistiram em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico 99:1 (v/v);

4,01-6,30 min: eluição do NFG, utilizando-se formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN contendo 0,1% de ácido fórmico 50:50 (v/v);

5,70-6,30 min: acoplamento entre as colunas, tendo como fase móvel formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN contendo 0,1% de ácido fórmico 50:50 (v/v);

6,30-10,0 min: análise do NFG na coluna analítica ZIC-HILIC, utilizando-se formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN contendo 0,1% de ácido fórmico 50:50 (v/v);

6,31-10,0 min: recondiçõamento da coluna RAM-BSA com soluçõo aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico/ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico 99:1 (v/v);

A vazõo da primeira dimensõo foi 0,3 mL/min e na segunda dimensõo foi de 0,1 mL/min. O volume de injeçõo foi 10 µL.

Preparo de soluções e amostras

Soluçõo de NFG 500 ng/mL preparada em águ

Soluçõo-estoque de NFG (100 µg/mL) foi preparada em águ. Para preparar a soluçõo de trabalho, 5 µL da soluçõo-estoque foram alíquotados e transferidos para eppendorf, contendo 495 µL de águ, obtendo-se a concentraçõo de 1 µg/mL. À esta soluçõo, 500 µL de acetato de etila foram adicionados e após agitaçõo em vórtex por 60 s, 250 µL da fase aquosa foram transferidos para eppendorf contendo 250 µL de águ, sendo a concentraçõo de 500 ng/mL de NFG obtida.

Soluções de calibraçõo utilizadas para avaliar linearidade na fragmentaçõo do NFG na fonte de ionizaçõo

Preparou-se soluçõo-estoque de NFG (100 µg/mL) em águ. A partir desta soluçõo, soluções-estoques intermediárias foram preparadas, nas seguintes concentrações: 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 40,0 µg/mL. Alíquotaram-se 10 µL de cada soluçõo-estoque intermediária, individualmente, e transferiram-se para balõo volumétrico de 1 mL, os

quais foram avolumados com água, gerando soluções de calibração com as seguintes concentrações: 200, 250, 300, 350, 400 ng/mL.

Amostra de urina artificial fortificada com NFG a 500 ng/mL

Solução-estoque de NFG (100 µg/mL) foi preparada em água. Para preparar a solução de trabalho, 5 µL da solução-estoque foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 495 µL de urina artificial, obtendo-se a concentração de 1 µg/mL. À esta solução, 500 µL de acetato de etila foram adicionados e, após agitação em vórtex por 60 s, 250 µL da fase aquosa foram transferidos para eppendorf contendo 250 µL de água, sendo a concentração de 500 ng/mL de NFG obtida.

Amostra de urina humana ou artificial brancas

Transferiu-se para eppendorf de 2 mL uma alíquota de 500 µL de urina humana ou artificial. Adicionaram-se 500 µL de acetato de etila e, após agitação em vórtex por 60 s, 250 µL da fase aquosa foi transferida para eppendorf contendo 250 µL de água, sendo a urina diluída duas vezes.

3.4.2. Desenvolvimento de método para quantificação de NFG por LC-IT-MS/MS

Para otimização das condições de ionização, realizou-se infusão de uma solução aquosa de NFG (1 µg/mL) diretamente na fonte de ionização com auxílio de uma bomba-seringa. Os parâmetros de ionização

foram otimizados no modo *expert tune* do software Daltonics Esquire. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 3,86 kV; pressão de nebulização: 30,0 psi; temperatura de dessolvatação: 325 °C; vazão do gás de dessolvatação: 900 L/hr, amplitude de fragmentação: 1,00 V *target* 50000 e *max. accu. time* 100.00 ms. O espectrômetro de massa operou no modo de monitoramento de íons-filhos, sendo o íon molecular desprotonado, isolado e fragmentado. Para quantificação, monitorou-se o íon-fragmento m/z 138 e para quantificação monitorou-se a razão entre os íons m/z 138 e m/z 113.

O sistema 3 (item 3.1.) utilizado neste método foi configurado no modo unidimensional, sendo a coluna RAM-BSA C₈ utilizada no modo simples de análise, realizando a exclusão das macromoléculas e, posteriormente, atuando como coluna analítica.

As condições cromatográficas desenvolvidas para o método consistiram em:

0,00-4,00 min: exclusão das macromoléculas, tendo como fase móvel solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico;

4,01-9,80 min: eluição do NFG, utilizando-se formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN 30:70 (v/v);

9,80-15,0 min: acondicionamento da coluna RAM-BSA com solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico;

A vazão utilizada foi de 0,3 mL/min, sendo que após a saída da coluna RAM-BSA C₈ utilizou-se um divisor de vazão, de modo que apenas 0,1 mL/min da vazão fosse enviado ao sistema MS. E na segunda dimensão foi de 0,1 mL/min. O volume de injeção foi 20 µL.

Preparo das soluções de trabalho

Uma solução-estoque de NFG 10 mg/mL foi preparada em água. A partir da solução-estoque, soluções de trabalho intermediárias foram preparadas em água na concentração de 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800 e 3200 µg/mL. De cada uma destas soluções, 5 µL foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 995 µL de *pool* de água, obtendo-se soluções de calibração na concentração de 4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 µg/mL. Na sequência foram aliqüotados 500 µL de cada solução, individualmente, transferindo-se para eppendorf contendo 500 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 µL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico.

Para definição das concentrações das soluções de controle de qualidade (CQ), foram utilizados os critérios estabelecidos pelos guias internacionais de validação de métodos bioanalíticos, descritos no item 3.3.2 - *Preparo das soluções de trabalho*. As soluções de trabalho nas concentrações de 1000, 1400 e 2600 µg/mL foram preparadas a partir da solução-estoque intermediária de 1 mg/mL de NFG. De cada solução de trabalho, 5 µL foram aliqüotados e transferidos, individualmente, para eppendorf, contendo 995 µL de água, obtendo-se soluções nas concentrações: CQB = 5,00 µg/mL, CQM = 7,00 µg/mL e CQA = 13,0 µg/mL. Em seguida, 500 µL de cada solução, foram aliqüotados e transferidos, individualmente, para eppendorf contendo 500 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 µL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico. Todas as soluções foram mantidas a -20 °C.

Preparo das amostras

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata, a partir das soluções de trabalho em água nas concentrações de 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800 e 3200 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma destas soluções, 5 μL foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 495 μL de *pool* de urina e 500 μL de água e obtendo-se soluções de calibração na concentração de 4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 $\mu\text{g/mL}$. Na sequência, 500 μL de cada solução foram aliqüotados, individualmente, e transferidos para eppendorf contendo 500 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 μL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico.

As amostras de controle de qualidade foram preparadas em quintuplicata, a partir das soluções de trabalho em água nas concentrações de 1000, 1400 e 2600 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma destas soluções 5 μL foram aliqüotados e transferidos para eppendorf, contendo 495 μL do *pool* de urina e 500 μL de água, obtendo-se soluções na concentração de CQB = 5,00 $\mu\text{g/mL}$, CQM = 7,00 $\mu\text{g/mL}$ e CQA = 13,0 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, 500 μL de cada solução foram aliqüotados e transferidos, individualmente, para eppendorf contendo 500 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 μL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico. Todas as soluções foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Validação

Os critérios adotados para avaliar a seletividade, LQ, LD, linearidade, precisão e exatidão foram os mesmos descritos no item 3.3.2 - *Validação do método*.

A linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação (r) obtido, o qual deve ser maior ou igual a 0,98. O valor de r foi calculado por meio da construção de uma curva de calibração, preparada na matriz em sete níveis de concentração (4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. O modelo matemático utilizado para representar os dados obtidos foi a regressão linear.

A precisão e exatidão intra e interdias foram avaliadas em três lotes de controle de qualidade, preparados em quintuplicata. A precisão, expressa em porcentagem, foi avaliada calculando-se o coeficiente de variação (CV) entre as replicatas. Já a exatidão, também expressa em porcentagem, foi calculada através da razão entre as médias das concentrações obtidas para as replicatas dos controles de qualidade e a concentração nominal.

A estabilidade de autoinjeter foi avaliada a partir da análise de um lote de controle de qualidade assim que preparado (t_0) e após 48 (t_{48}) e 68 horas (t_{68}) do preparo, armazenado em temperatura ambiente. A exatidão do t_0 foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação à curva média. Já a exatidão do lote t_{48} e t_{68} foi calculada a partir da interpolação das áreas em relação a uma curva recém-preparada e injetada imediatamente anterior ao respectivo lote.

Para avaliar a estabilidade após ciclos de degelo, um lote de controle foi preparado e analisado imediatamente (Dt_0). Na sequência, este foi congelado por 24 hrs (Dt_{24}) e 60 hrs (Dt_{60}), degelado e analisado. A

exatidão para o Dt0 foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação a uma curva média e para Dt24 e Dt60 em relação a uma curva injetada imediatamente anterior ao lote Dt24.

Neste trabalho o efeito de matriz (EM) foi avaliado qualitativamente e quantitativamente. O EM qualitativo foi avaliado por meio de infusão pós-coluna do NFG em água na concentração de 7,00 µg/mL com o auxílio de uma bomba-seringa, na vazão de 10 µL/min. Concomitantemente, 20 µL da urina *pool*, urina artificial e a água foram injetadas individualmente no sistema de LC, passando pela coluna RAM-BSA C₈, nas condições cromatográficas estabelecidas.

Foram avaliados efeito de matriz (EM), a recuperação (RE) e a eficiência do processo (EP)⁶¹, já que neste método realizou-se extração líquido-líquido (LLE) na amostra, antes da injeção na coluna RAM-BSA. O EM foi calculado levando-se em consideração a razão entre lotes de controle de qualidade fortificados pós-procedimento de LLE e controles preparados em água. Já a recuperação foi calculada considerando a razão entre lotes de controles fortificados, antes do processo de LLE e controles fortificados após LLE. Por último, levou-se em conta a eficiência de todo o processo, calculando a razão entre lotes de controles fortificados antes do procedimento de LLE e controles em água. Este protocolo foi realizado para CQB, CQM e CQA.

Aplicação do método

Para aplicar o método, fortificaram-se as amostras que compunham o *pool* de urina utilizado na validação, sendo três indivíduos do sexo masculino, denominados H1, H2 e H3, e três indivíduos do sexo feminino, denominados M1, M2 e M3. Essas amostras foram fortificadas individualmente, na concentração de 5,50 e 11,0 $\mu\text{g/mL}$, a fim de mimetizar urinas de indivíduos contaminados com NFG. Para o preparo dessas soluções, a partir das soluções-estoque de 1,00 mg/mL de NFG, prepararam-se soluções de trabalho intermediárias nas concentrações de 1100, e 2200 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma destas soluções, 5 μL foram aliqotados e transferidos para eppendorf, contendo 495 μL de urina e 500 μL de água, obtendo-se soluções na concentração de 5,50 e 11,0 $\mu\text{g/mL}$. Essas soluções foram centrifugadas, e 500 μL do sobrenadante foram retirados e transferidos para eppendorf contendo 500 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 μL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico. Este procedimento foi realizado individualmente para urina dos seis indivíduos doadores.

As amostras foram injetadas no sistema LC-IT-MS/MS, nas condições cromatográficas estabelecidas e avaliadas, comparando-se com uma curva de calibração preparada com o *pool* de urina, conforme descrito no item *Preparo de amostra*.

Adição de padrão

Para construção da curva de calibração por adição de padrão, a partir de solução-padrão-estoque de NFG em água na concentração de 1,00

mg/mL, prepararam-se soluções-padrão de trabalho intermediárias nas concentrações de 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 e 1500 µg/mL. Uma alíquota de 500 µL das urinas dos indivíduos H1, M2 e M3 (5,50 µg/mL de NFG) e dos indivíduos H2, H3 e M1 (1,00 µg/mL de NFG) foi transferida para eppendorf contendo 495 µL de água e 5 µL das soluções-padrão de trabalho intermediárias. Após homogeneização, alíquota de 500 µL desta solução foi transferida para eppendorf, contendo 500 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 60 s, com auxílio de uma seringa e agulha, 300 µL da fase aquosa foram transferidos para o vial e injetados no sistema cromatográfico. As amostras preparadas foram analisadas no sistema cromatográfico nas condições estabelecidas, e a curva de calibração individual foi construída, sendo a regressão linear o modelo matemático escolhido para representar o conjunto de dados. Igualando-se o valor de y a zero, obteve-se o valor de x que representa a concentração de NFG adicionada a cada urina individual.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

4. Resultados e Discussões

4.1. Quantificação de fenil- β -D-glucuronídeo em urina humana por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS

A cromatografia no modo bidimensional (2D-LC) com injeção direta de amostra é uma ferramenta bastante atrativa em bioanálise por proporcionar alta reprodutibilidade, perda mínima de amostra, baixa contaminação e análises com alto rendimento.

Nesse sistema, a compatibilidade entre as duas dimensões deve ser avaliada em relação à fase móvel, vazão e tubulação/conexões. Além disso, para melhorar a capacidade de pico, é necessário investigar o tipo de fase estacionária, tamanho das partículas e as dimensões das colunas cromatográficas.

Quando um sistema 2D-LC encontra-se acoplado a um espectrômetro de massa, o desenvolvimento do método bioanalítico torna-se um desafio, uma vez que as condições de análise da segunda dimensão cromatográfica devem atender às exigências necessárias para o melhor desempenho da fonte de ionização empregada.

Sendo assim, os parâmetros descritos na FIGURA 4.1 devem ser criteriosamente otimizados no desenvolvimento de um método 2D-LC-MS/MS.¹¹⁸

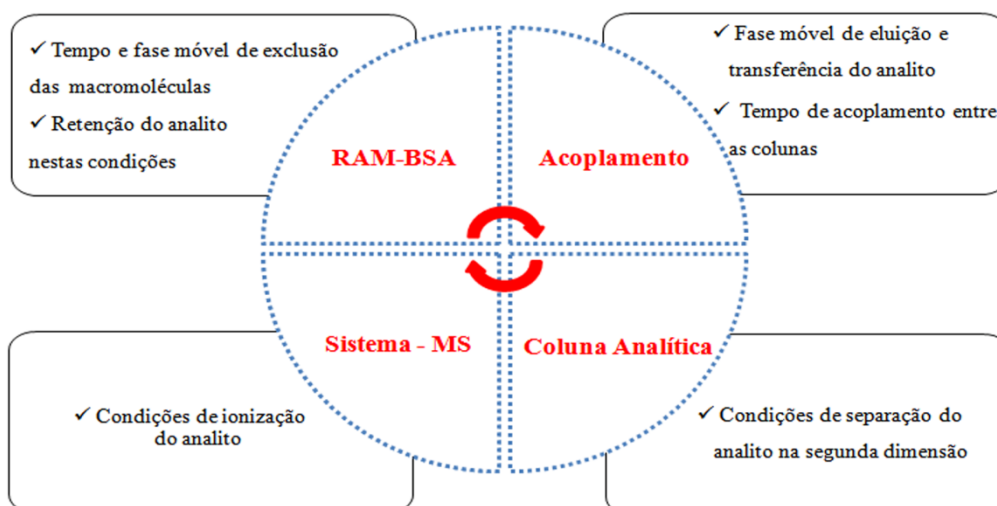


FIGURA 4. 1: Parâmetros que devem ser avaliados no desenvolvimento de um método 2D-LC-MS/MS.

4.1.1. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema UHPLC-QqQ

Avaliação das colunas RAM-BSA

As colunas RAM-BSA são excelentes ferramentas aplicadas em análises com injeção direta de amostra, pois possibilitam a exclusão das macromoléculas da matriz e a extração *on-line* dos analitos de interesse.¹¹⁹

As fases hidrofóbicas têm sido amplamente empregadas neste grupo de pesquisa^{92,93,98} para a análise de fármacos em amostras biológicas. Porém, compostos polares e ionizáveis apresentam baixa retenção nestes suportes, e uma alternativa para solucionar esta limitação seria a utilização de fases do tipo IEX.

O mecanismo de retenção nos suportes IEX se dá pela competição entre o contra-íon presente na fase estacionária e os íons presentes na amostra. Assim, fatores que podem influenciar na retenção e

seletividade do analito, como pH, natureza e concentração do contra-íon da fase móvel, devem ser cuidadosamente avaliados, durante o desenvolvimento do método.^{113,119}

Para o presente trabalho, foram preparadas colunas RAM-BSA utilizando-se os suportes de troca aniônica forte (SAX) e octilsílica (C₈) (FIGURA 4.2).

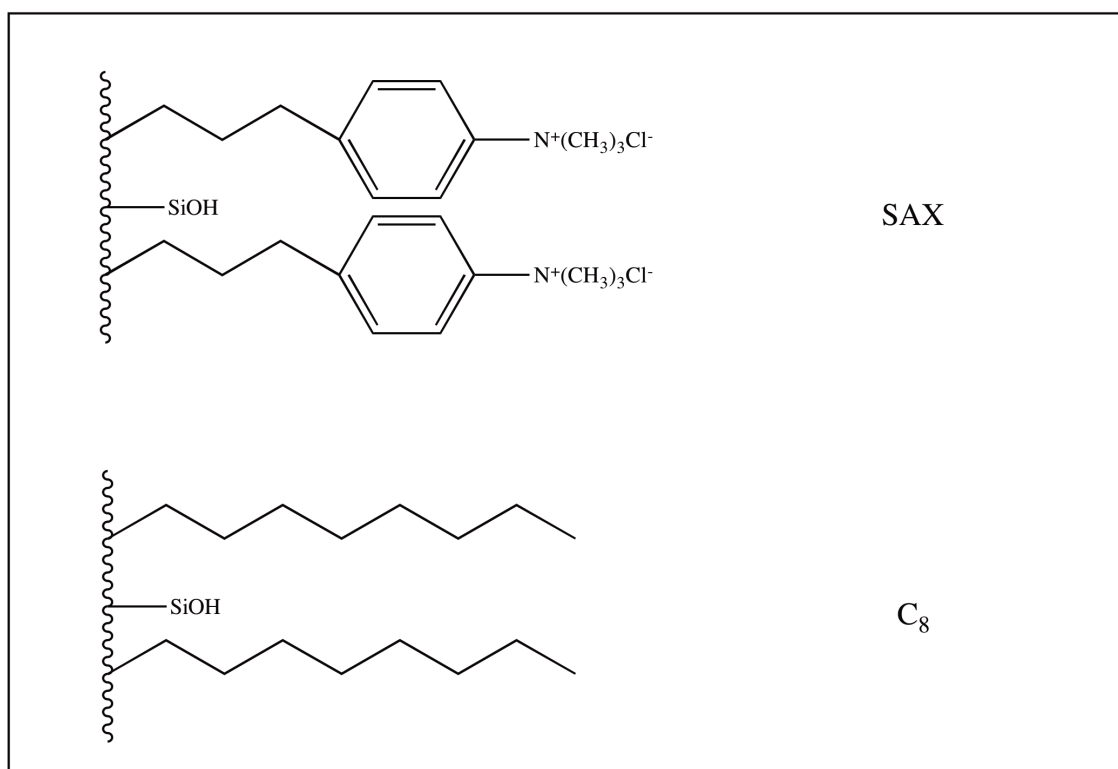


FIGURA 4. 2: Suportes cromatográficos selecionados para o preparo das fases do tipo RAM-BSA

As colunas RAM imobilizadas com albumina sérica bovina (RAM-BSA) foram preparadas de acordo com protocolo bem estabelecido no grupo, adaptado do proposto por Menezes e Félix⁸⁸.

A capacidade das colunas RAM-BSA de excluir macromoléculas, geralmente, é avaliada utilizando o método de Bradford¹²⁰. Neste método as proteínas totais são quantificadas através da

interação destas com o corante Coomassie Brilliant Blue (CBB), formando um complexo proteína-CBB que apresenta absorvância máxima em 596 nm. No entanto, a urina é uma matriz pobre em proteína, o que torna este método ineficiente para quantificação das macromoléculas existentes em sua composição. Dessa forma, a capacidade de exclusão das colunas RAM-BSA preparadas neste trabalho foi avaliada cromatograficamente por LC-UV com injeção de urina humana (sem diluição). O perfil cromatográfico das macromoléculas excluídas foi monitorado em 254 nm onde diversos compostos absorvem. Dessa forma pode-se estabelecer a fase de eluição mais eficiente para a exclusão das macromoléculas da matriz.

a) RAM-BSA C₈

Em relação ao perfil de exclusão, as fases móveis listadas na TABELA 4.1 foram avaliadas, sendo a fase composta por água e ACN na proporção de 99:1 (v/v) selecionada, pois nesta condição menor tempo de exclusão (4 min) foi observado (FIGURA 4.3). No entanto, em ambas as fases móveis, notou-se eluição de interferentes, após a exclusão das macromoléculas, sugerindo a necessidade de se utilizar um sistema LC-MS/MS para quantificar FG em urina.

TABELA 4. 1: Fases móveis usadas na avaliação da exclusão das macromoléculas da urina na RAM-BSA C₈

Condição	Fase móvel
1	Água
2	99% água/1% ACN

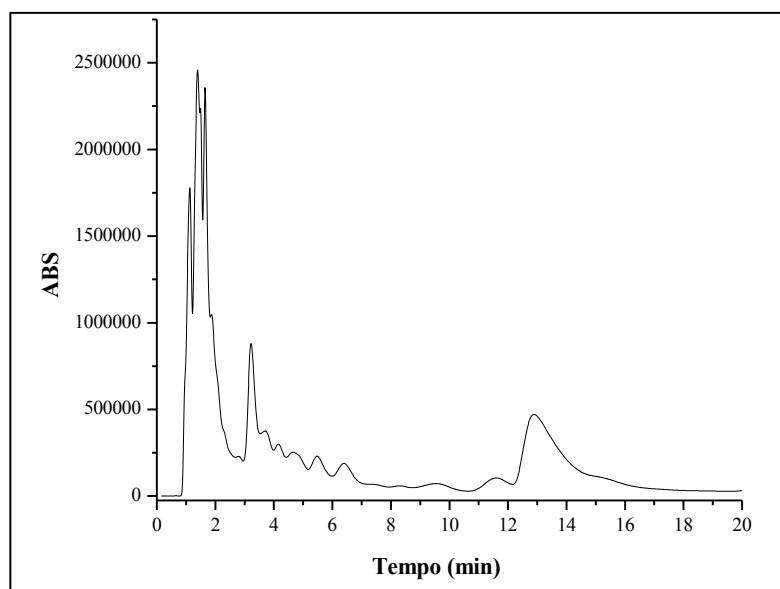


FIGURA 4. 3: Cromatograma referente à exclusão das macromoléculas da urina pela RAM-BSA C₈. Fase móvel: 99% água purificada/1% ACN, vazão: 0,5 mL/min, λ : 254 nm, volume de injeção: 50 μ L

Em relação à capacidade de retenção da coluna RAM-BSA C₈ para o analito FG, fez-se necessário um estudo da influência da variação do pH da fase móvel. Para tanto, utilizou-se tampão fosfato de potássio 10 mM e ACN na proporção de 95:5 (v/v), sendo os valores de pH avaliados 2,5; 6,0; 6,5 e 7,0 (excluindo-se o pH 4,5, pois este corresponde ao ponto isoelétrico da albumina).

No gráfico da FIGURA 4.4, observa-se a variação no tempo de retenção em relação ao pH. Conforme esperado, o maior tempo de retenção foi obtido, quando o pH da fase móvel correspondia a 2,5. Neste pH o FG

não se encontra ionizado, portanto, sua interação com a fase hidrofóbica C₈ foi maior.

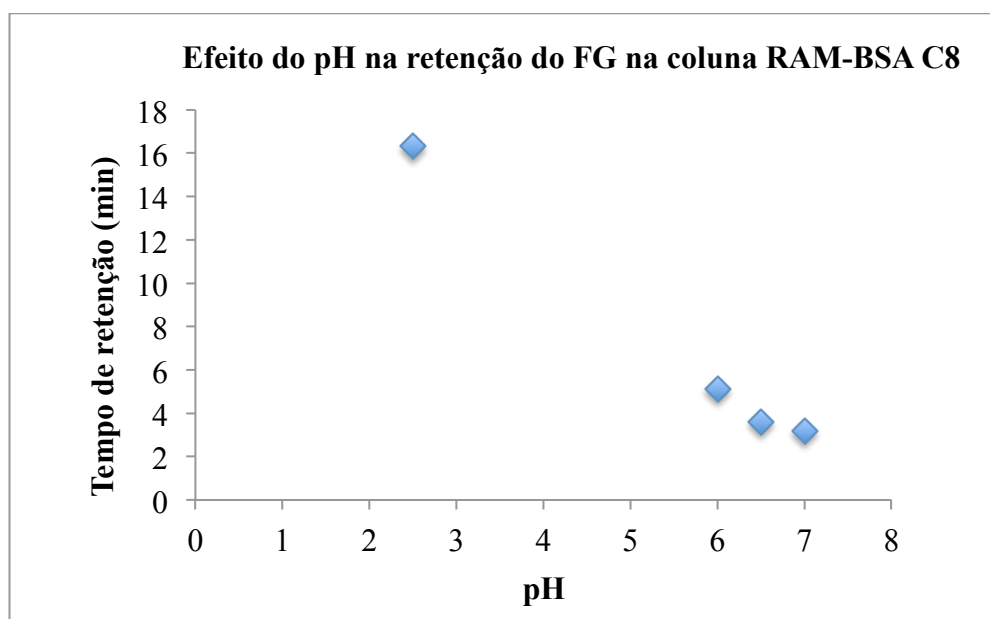


FIGURA 4. 4: Gráfico referente à influência do pH na retenção do FG na coluna RAM-BSA C₈. Fase móvel: 95% tampão fosfato 10 mM, 5% ACN, vazão: 0,5 mL/min, 254 nm, volume de injeção: 50 µL

b) RAM-BSA SAX

O perfil cromatográfico das macromoléculas presentes na urina humana foi avaliado, utilizando-se as fases móveis descritas na TABELA 4.2. Dentre as condições investigadas, a fase móvel composta por solução aquosa de formiato de amônio 1 mM pH 5 apresentou melhor resultado com tempo de exclusão das macromoléculas de 4 min (FIGURA 4.5).

TABELA 4. 2: Fases móveis avaliadas na exclusão das macromoléculas da urina na coluna RAM-BSA SAX

Condição	Fase móvel
1	Água
2	Acetato de amônio pH 5
3	Acetato de amônio pH 6,7
4	Acetato de amônio pH 2,5
5	Formiato de amônio 1 mM pH 5

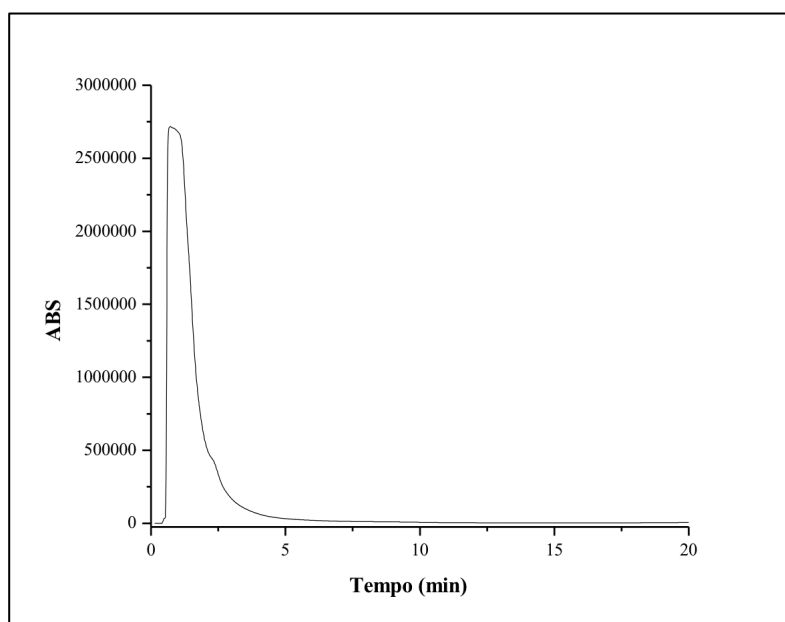


FIGURA 4. 5: Perfil de exclusão das macromoléculas da urina pela RAM-BSA SAX. Fase móvel: Formiato de amônio 1mM pH 5, vazão: 0,5 mL/min, λ : 254 nm, volume de injeção: 50 μ L

Considerando a utilização de um sistema LC-MS/MS no desenvolvimento do método de quantificação de FG em urina, o tampão formiato de amônio foi selecionado para o estudo das condições cromatográficas com a coluna RAM-BSA SAX.

O efeito do pH e a concentração do tampão são fundamentais para retenção em troca iônica. Para avaliar esses efeitos, sem a influência

da BSA imobilizada, uma coluna de SAX Nucleosil foi empacotada para seleção dessas condições.

A faixa de pH avaliada foi de 5,0 a 6,5 para formiato de amônio na concentração de 40 mM. No gráfico da FIGURA 4.6, pode-se observar que o tempo de retenção praticamente não variou em cada pH estudado.

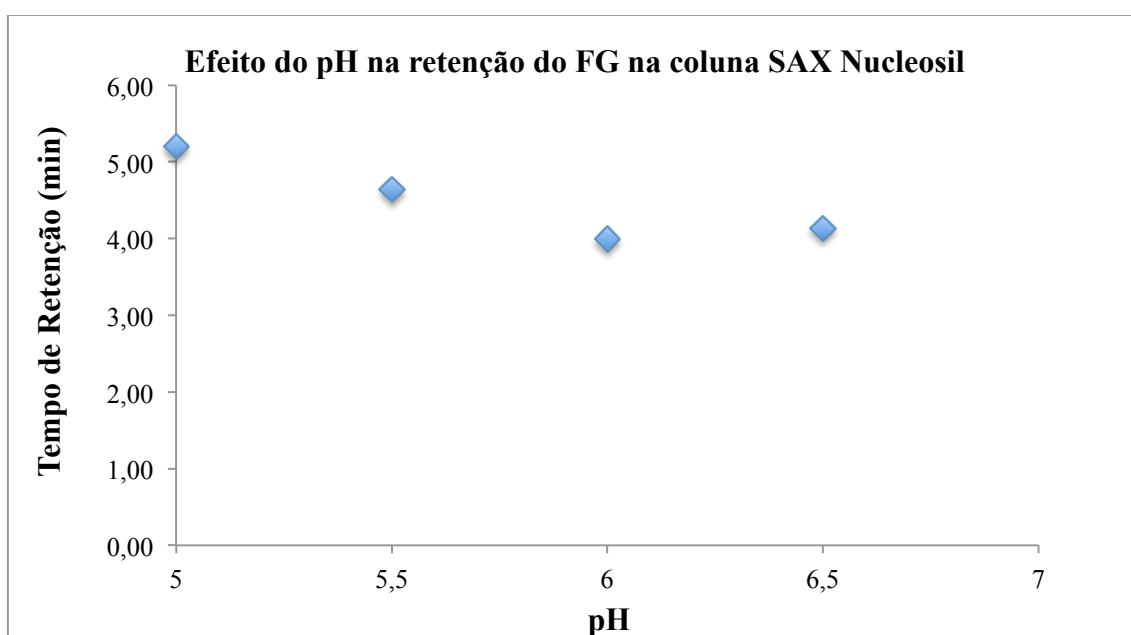


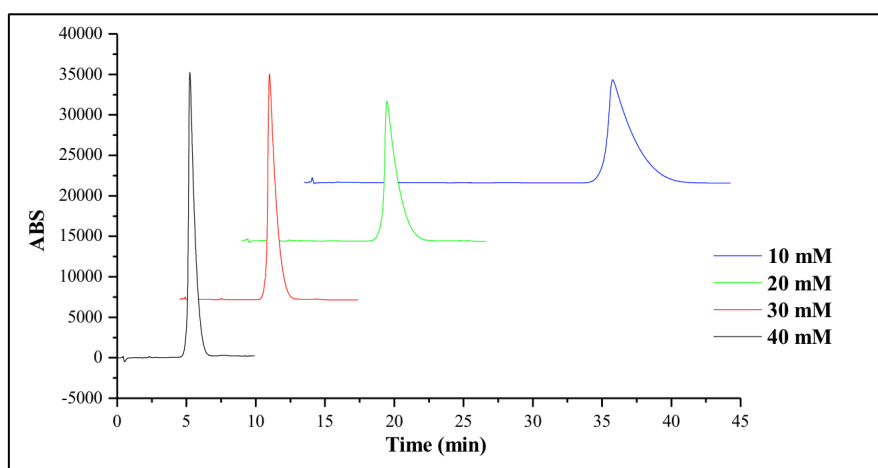
FIGURA 4. 6: Gráfico referente à influência do pH na retenção do FG na coluna SAX Nucleosil. Fase móvel: tampão formiato de amônio 40 mM, vazão: 0,5 mL/min, λ : 254 nm, volume de injeção: 50 μ L

Essa tendência é esperada, visto que em valores de pH maiores ou iguais a 5, o FG ($pK_a = 2,75$) encontra-se totalmente ionizado. Diante disso, o pH 5 foi selecionado, já que está duas unidades acima do valor de pK_a do FG.

Na sequência, investigou-se a influência da concentração (10; 20, 30 e 40 mM) do tampão formiato de amônio pH 5 na variação do tempo de retenção do FG, paralelamente, nas colunas RAM-BSA SAX e SAX Nucleosil. O mesmo perfil de retenção para o FG foi observado em ambas

as colunas (FIGURA 4.7), evidenciando que o mecanismo de troca iônica do suporte não foi afetado. No entanto, notou-se alteração no formato da banda dos cromatogramas obtidos com a RAM-BSA SAX, o que está relacionado com a perda em eficiência da coluna após imobilização da albumina. A concentração de 40 mM para o tampão formiato foi selecionada, pois proporcionou maior retenção do FG.

A)



B)

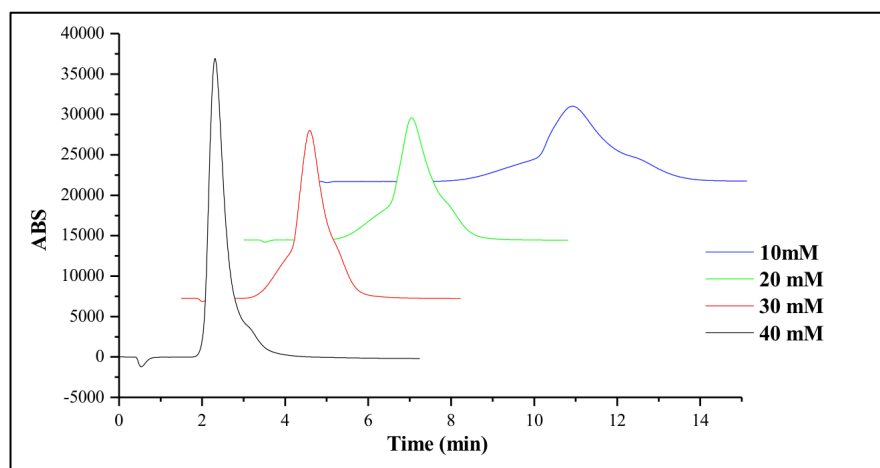


FIGURA 4. 7: Comparação entre o perfil de retenção da coluna SAX Nucleosil (A) e da coluna RAM-BSA SAX (B). Vazão de 0,5 mL/min, $\lambda = 266$ nm, coluna SAX 50 x 2,1 mm, injeção de 50 μ L

Após o estudo sistemático das condições cromatográficas na coluna SAX Nucleosil, as condições otimizadas (solução aquosa de formiato de amônio 40 mM, pH 5) foram, portanto, aplicadas para a coluna RAM-BSA SAX.

Em relação às colunas RAM-BSA avaliadas, a RAM-BSA SAX se mostrou mais eficiente que a RAM-BSA C₈, apresentando excelente capacidade de exclusão das macromoléculas presentes na urina e retenção do FG. No entanto, por se tratar de uma coluna de troca aniônica forte, necessitou-se de alta concentração de tampão na composição da fase móvel (40 mM) para se obter reprodutibilidade na retenção do FG. As condições cromatográficas definidas para a coluna RAM-BSA SAX não foram compatíveis com o sistema LC-MS/MS avaliado, portanto, a coluna RAM-BSA C₈ foi escolhida para o desenvolvimento do método.

Acoplamento

Nesta etapa do trabalho, procedeu-se à diluição da urina com água na proporção de 1:1 v/v. Esta estratégia foi adotada baseando-se em trabalhos na literatura onde a técnica de diluir e injetar (*dilute-and-shoot*) foi empregada com sucesso na tentativa de minimizar o efeito de matriz.^{40,121-123}

Considerando que a coluna RAM-BSA C₈ foi selecionada para o desenvolvimento das condições analíticas para quantificação de FG em urina, o tampão fosfato de potássio pH 2,5 anteriormente avaliado, foi substituído por solução aquosa contendo 0,1% v/v de ácido fórmico (AF).

A fim de determinar o intervalo de acoplamento entre as colunas da primeira e segunda dimensão, determinou-se a fase móvel de eluição e transferência do FG para a coluna analítica, levando-se em

consideração as condições estabelecidas para a exclusão das macromoléculas. Assim, avaliou-se o percentual de ACN como modificador orgânico por meio da injeção de FG em água a 500 ng/mL na coluna RAM-BSA C₈, de acordo com as condições descritas na TABELA 4.3.

TABELA 4. 3: Condições empregadas na coluna extratora RAM BSA C₈ (50 x 2,1 mm, 10 µm)

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água/ACN	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 - 6,20	água + 0,1 % AF/ACN	diferentes proporções	Eluição dos glucuronídeos
6,21 - 10,00	água/ACN	99:1	Recondicionamento da coluna RAM

AF = ácido fórmico; volume de injeção: 10 µL; vazão: 0,5 mL/min

Os resultados evidenciaram que, em todas as proporções avaliadas, o FG ficou retido na coluna RAM-BSA C₈ durante a exclusão (FIGURA 4.8). Com isso, optou-se por utilizar como fase de transferência solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e ACN na proporção de 70:30 v/v, sendo o intervalo de acoplamento estabelecido entre 5,30 e 6,20 min.

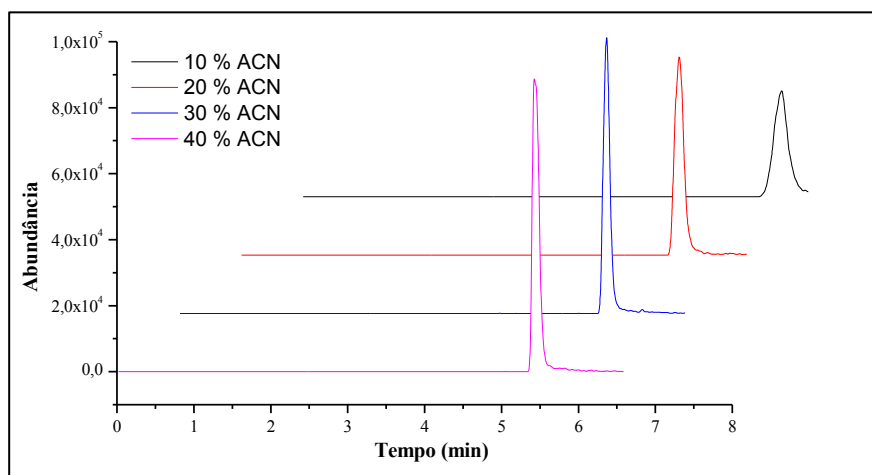


FIGURA 4. 8: Cromatograma de íons totais do estudo da variação do percentual de ACN (10 a 40%) na fase móvel utilizada na retenção do FG na coluna RAM-BSA C₈; ESI⁻; SRM m/z 269,1 \rightarrow 92,60 e m/z 269,1 \rightarrow 113,0

A coluna utilizada na segunda dimensão foi uma Luna C₈ (150 x 2,1 mm, 10 μ m), sendo a fase móvel isocrática contendo solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e ACN e contendo 0,1% de ácido fórmico na proporção de 40:60 v/v, estando as condições de acoplamento resumidas na TABELA 4.4.

TABELA 4. 4: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM-BSA C₈ x C₈

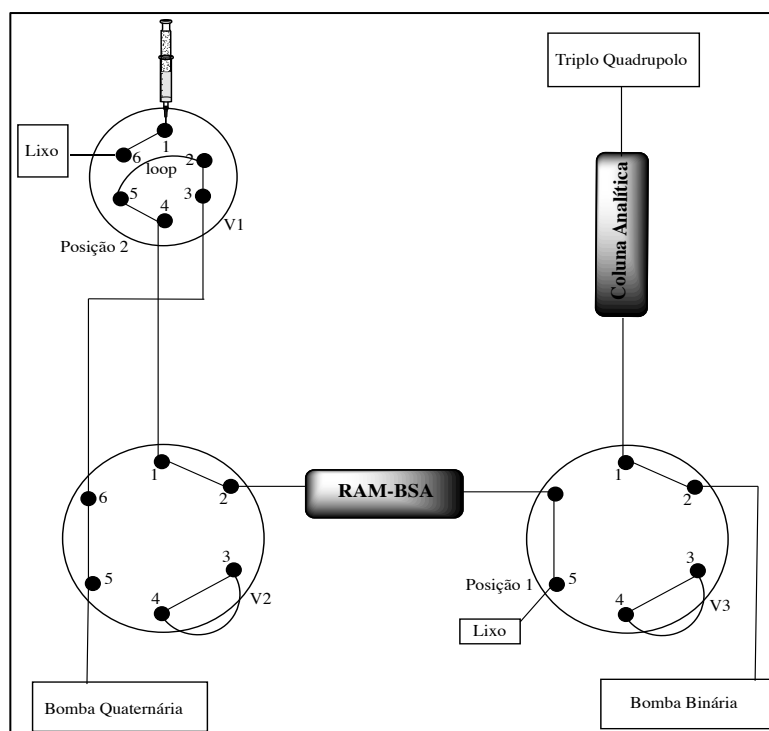
Tempo (min)	Fase móvel	Proporção	
		da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água/ACN	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,00 - 6,20	água + 0,1 % AF/ACN	70:30	Eluição do glucuronídeo
4,30-6,20	água + 0,1 % AF/ACN	70:30	Acoplamento entre as colunas
6,20 - 10,00	água/ACN	99:1	Recondicionamento da coluna RAM

AF = ácido fórmico; volume de injeção: 10 μ L; vazão: 0,5 mL/min

Sistema 2D-LC-MS/MS

O sistema cromatográfico (FIGURA 4.9) utilizado nesta etapa do trabalho consistiu em um cromatógrafo líquido de ultraeficiência (UHPLC), acoplado a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo (QqQ) com ionização por *electrospray*. Uma bomba quaternária e outra binária e ainda um arranjo de três válvulas (1 válvula de injeção com caminho de 0,4 mm d.i., suportando até 5000 psi e 2 válvulas comutadoras com caminho de 0,2 mm d.i., suportando até 15000 psi) foram especialmente configurados para injeção direta de amostras biológicas.

A)



B)

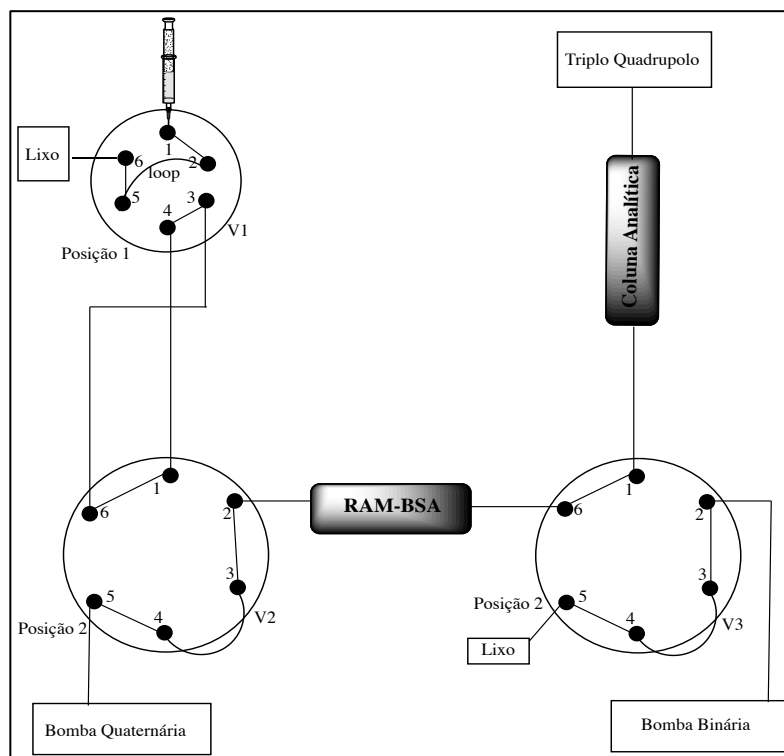


FIGURA 4. 9: Válvulas que compõem o sistema UHPLC-MS/MS. A) Sistema desacoplado e B) Sistema durante o acoplamento

A otimização da ionização e da fragmentação do FG foi realizada combinando-se a vazão vinda da bomba-seringa, contendo solução-padrão de FG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preparada em água com a vazão vinda do LC (solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e ACN na proporção de 70:30 v/v). No esquema da FIGURA 4.10, tem-se a estrutura do FG e dos seus íons-produtos mais intensos.

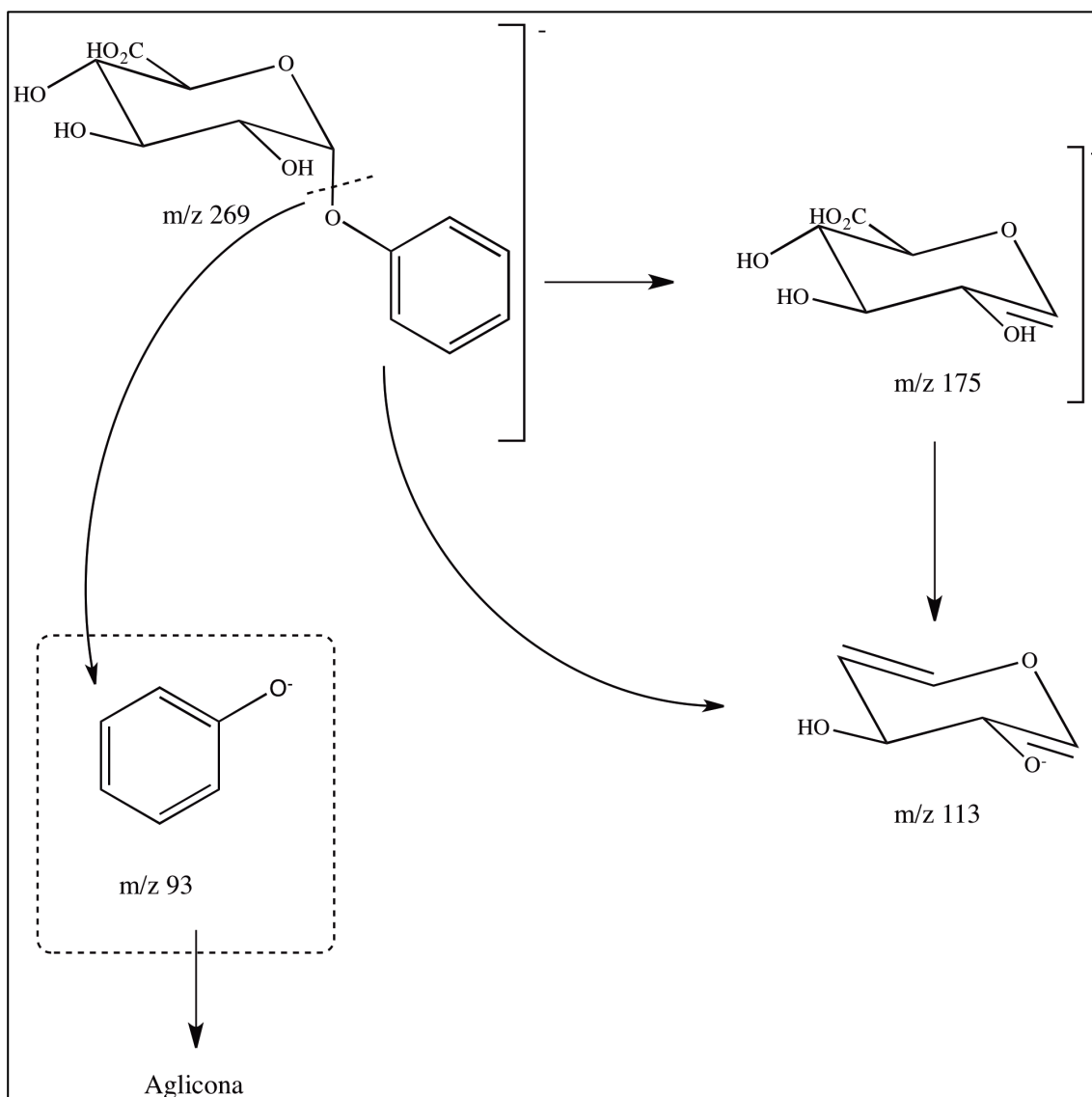


FIGURA 4. 10: Estrutura do FG e seus íons-fragmentos

As transições selecionadas para monitoramento foram escolhidas, baseando-se em dados da literatura¹²⁴ e especialmente por corresponderem aos íons-produtos de maior intensidade. No entanto, como o FG é uma molécula pequena, a única transição seletiva é a referente à porção aglicona (m/z 269,1 \rightarrow 92,60). As condições de ionização e fragmentação otimizadas estão descritas na TABELA 4.5.

TABELA 4. 5: Condições de ionização e fragmentação para FG por ESI

Parâmetros de ionização	Íon-precursor (m/z) [M-H] ⁻	Transição SRM (m/z)	Energia de Colisão (eV)
Capilar: 2 kV Cone: 23 V Temperatura de dessolvatação: 500 °C Gás de dessolvatação: 1000 L/hr	269,1	92,60	33
		113,0	11

A FIGURA 4.11 mostra o cromatograma de íons totais obtidos para o padrão de FG em água (500 ng/mL) nas condições do acoplamento.

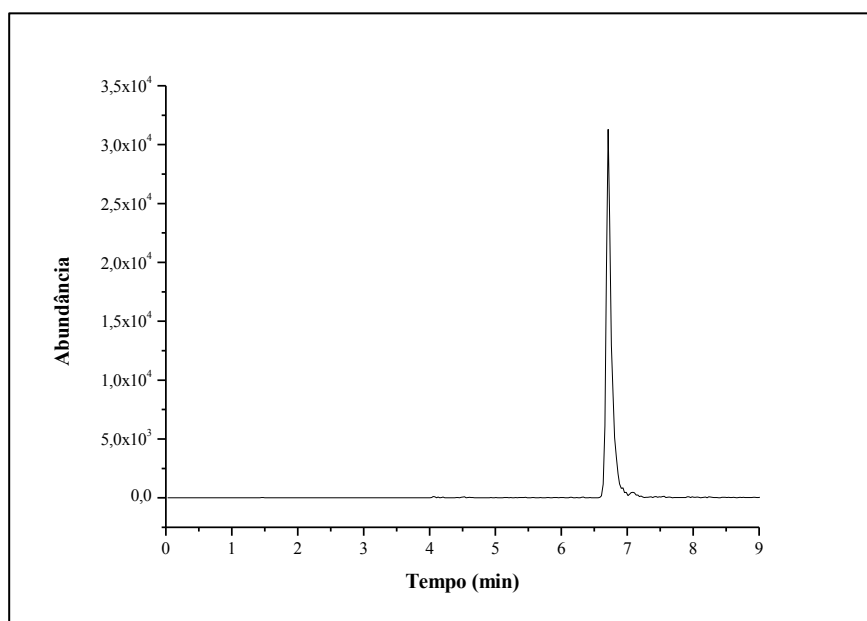


FIGURA 4. 11: Cromatograma de íons totais obtido para o FG no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C₈ e a coluna analítica C₈; ESI⁻; SRM m/z 269,1 → 92,60 e m/z 269,1 → 113,0

Para avaliar a seletividade do método, injetaram-se 20 μL de urina branca, e uma banda com o mesmo tempo de retenção e nas mesmas transições monitoradas para o FG foi detectada (FIGURA 4.12).

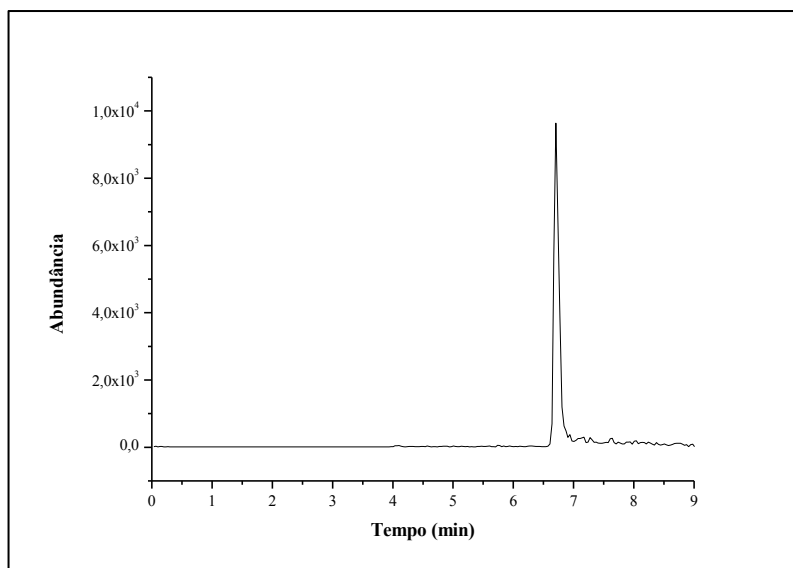


FIGURA 4. 12: Cromatograma de íons totais referente à banda observada no tempo de retenção do FG na análise de urina branca; ESI⁻; SRM m/z 269,1 \rightarrow 92,60 e m/z 269,1 \rightarrow 113,0

Considerando-se o resultado obtido, ficou evidente que as condições cromatográficas desenvolvidas não apresentaram seletividade. Dessa forma, na busca por maior eficiência na separação e diferente seletividade em relação à coluna Luna C₈ empregada, a coluna BEH-Fenil foi avaliada na segunda dimensão. De acordo com a equação de Van Deemter (FIGURA 4.13), que relaciona eficiência (H , μm), velocidade linear (μ , mm/s) e o tamanho da partícula (d_p), quanto menor o tamanho da partícula do suporte, maior a eficiência de separação¹²⁵. Assim, espera-se que a coluna BEH-Fenil que possui partículas de 1,7 μm seja mais eficiente do que a coluna Luna C₈ que possui partículas de 10 μm .

$$H = Adp + \frac{BD_M}{\mu} + \frac{Cd_p^2 \mu}{D_M}$$

D_M – coeficiente de difusão do analito

A –alargamento da banda cromatográfica devido à presença de diferentes caminhos no suporte

B – difusão do analito na fase móvel

C –transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária

FIGURA 4. 13: Equação de Van Deenter

Quanto à seletividade, a coluna BEH-Fenil difere da Luna C_8 , especialmente em relação a compostos aromáticos devido às interações do tipo π - π .

Assim, procedeu-se ao acoplamento entre a coluna RAM-BSA C_8 e a coluna BEH-Fenil, de acordo com as condições cromatográficas descritas na TABELA 4.6. A vazão utilizada em ambas as dimensões passou a ser de 0,3 mL/min com a finalidade de diminuir a pressão de volta do sistema. Na segunda dimensão, o percentual de ACN foi diminuído, a fim de proporcionar maior retenção do FG.

TABELA 4. 6: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM BSA C₈ x BEH-Fenil - Volume de injeção: 10 µL, vazão: 0,3 mL/min

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água + 0,1 % AF/ACN	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 - 6,10	água + 0,1 % AF/ACN	70:30	Eluição do glucuronídeo
6,10 - 7,10	água + 0,1 % AF/ACN	70:30	Acoplamento entre as colunas
7,10 - 10,00	água + 0,1 % AF/ACN	99:1	Recondicionamento da coluna RAM
7,10 - 10,00	água + 0,1 % AF/ACN	70:30	Análise do FG na coluna BEH-Fenil

Com as condições do método ajustadas, avaliou-se a seletividade por meio da injeção de 10 µL de urina branca e observou-se banda cromatográfica no mesmo tempo de retenção e nas mesmas transições monitoradas para o FG. Na sequência, investigou-se a possibilidade de “efeito-memória”, considerando que o FG poderia ficar retido na coluna ou em alguma tubulação do equipamento. Para tanto, injetou-se água logo após injeção de FG, e nenhuma banda foi detectada no tempo de retenção e nas transições monitoradas. No cromatograma da FIGURA 4.14, têm-se os cromatogramas de íons totais obtidos.

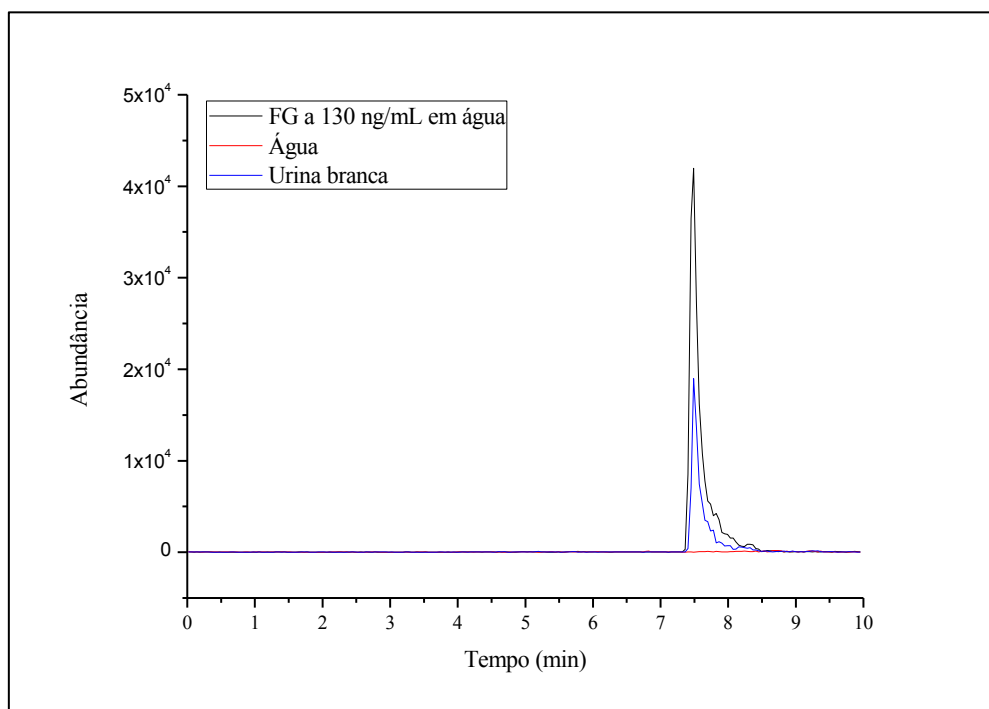


FIGURA 4. 14: Cromatograma de íons totais obtido para o FG no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C_8 e a coluna analítica BEH-Fenil; ESI; SRM m/z 269,1 \rightarrow 92,60 e m/z 269,1 \rightarrow 113,0

Diante dos resultados obtidos decidiu-se alterar o analisador para um *ion trap* (IT) na busca por diferentes condições analíticas que propiciassem a análise de FG em urina.

4.1.2. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema LC-IT-MS/MS

Avaliação da RAM-BSA C_8

Iniciou-se o desenvolvimento do método, ajustando-se as condições analíticas na coluna RAM-BSA C_8 . A fase móvel utilizada na exclusão das macromoléculas da urina foi solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, e o tempo de exclusão das macromoléculas foi de 4 min.

A fase de eluição e transferência do FG na RAM-BSA C₈ foi cuidadosamente avaliada, comparando-se diversas proporções de ACN/formiato de amônio pH 6,8, variando-se o percentual de ACN de 30% a 70%. Este estudo foi realizado injetando-se urina fortificada com FG (13 µg/mL) na coluna RAM-BSA numa vazão de 0,3 mL/min. Na FIGURA 4.15, pode-se observar que o analito fica retido na coluna RAM, durante o tempo de exclusão das macromoléculas. No entanto, não houve diferença significativa em relação ao tempo de retenção obtido para o FG, porém, como a fase móvel contendo 70% de ACN apresentou banda mais simétrica em relação às demais, foi a fase selecionada.

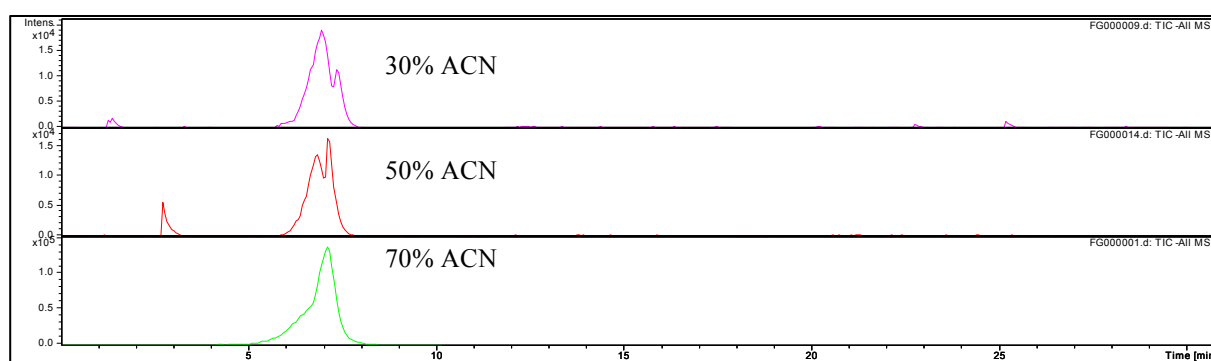


FIGURA 4. 15: Cromatograma de íons totais - avaliação do percentual de ACN na fase móvel da primeira dimensão - sistema LC-IT-MS/MS

Na sequência, investigou-se a influência do pH do tampão formiato de amônio, comparando-se a retenção do FG na coluna RAM em pH 6,8 e pH 2. E ainda, com o intuito de melhorar a simetria da banda cromatográfica, adicionaram-se 5 µL de ácido fórmico diretamente à amostra. Observou-se que, em pH 2, o analito apresentou maior retenção na coluna RAM, e a banda cromatográfica mostrou maior simetria. Assim, estabeleceu-se novamente o intervalo de acoplamento na coluna RAM-BSA (FIGURA 4.16), injetando-se FG em urina (7,00 µg/mL) com fase móvel e vazão otimizadas (ACN/formiato de amônio pH 2 70:30 v/v, numa

vazão de 0,2 mL/min).

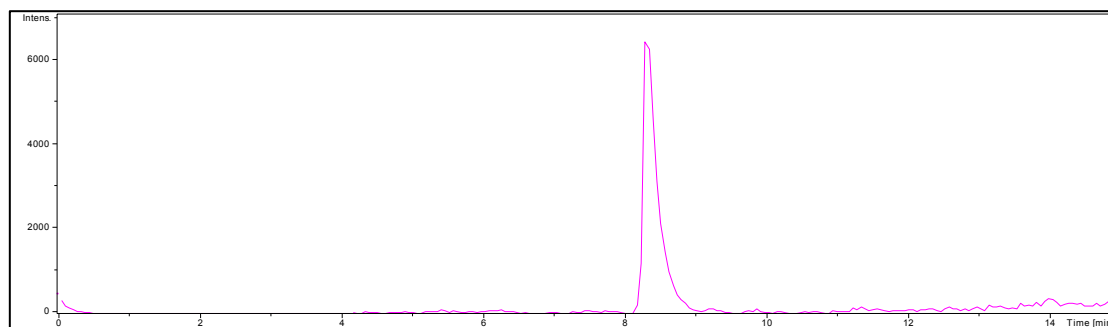


FIGURA 4. 16: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 – definição de novo intervalo de acoplamento (7,9-9,1 min) - sistema LC-IT-MS/MS

Acoplamento

Após o reajuste das condições cromatográficas da primeira dimensão, foi avaliado o acoplamento com a coluna Ascentis Express F5. Esta coluna tem como fase estacionária o pentafluorophenylpropyl (F5) e apresenta seletividade diferenciada em relação às fases hidrofóbicas C_8 e C_{18} tradicionais. Isso se deve às propriedades específicas das ligações carbono-flúor que apresentam elevado caráter dipolar e possibilidade de interação por transferência de carga devido à elevada eletronegatividade dos átomos de flúor. Ainda é possível ocorrerem interações do tipo π - π devido à presença do anel aromático, e a combinação de todos esses fatores torna as fases F5 eficientes na retenção de compostos polares.¹²⁶ É importante destacar que a coluna Ascentis Express F5 utilizada possui fase estacionária do tipo *fused core* que é constituída por partículas com núcleo de sílica fundida recoberto com fina camada de sílica porosa. Esta propriedade possibilita análises rápidas e eficientes, comparáveis às colunas empacotadas com partículas sub-2 μm , com a vantagem de não ser necessário o emprego de sistemas UHPLC.¹²⁷

O acoplamento foi realizado injetando-se urina fortificada com FG (7,0 µg/mL). As condições cromatográficas estão descritas na TABELA 4.7.

TABELA 4. 7: Condições cromatográficas utilizadas no acoplamento RAM BSA C₈ x Ascentis Express F5 - Vazão: 0,2 mL/min

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água + 0,1 % AF	100	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 – 7,90	água + 0,1 % AF/ACN	30:70	Eluição do FG
7,90 – 9,10	água + 0,1 % AF/ACN	30:70	Acoplamento entre as colunas
9,10 – 15,0	água + 0,1 % AF	100	Recondicionamento da coluna RAM
9,10-15,0	água + 0,1 % AF/ACN	30:70	Análise do FG na coluna Ascentis express F5

Sistema 2D-LC-IT-MS/MS

O sistema 2D-LC-IT-MS/MS foi configurado, de acordo com a FIGURA 4.17.

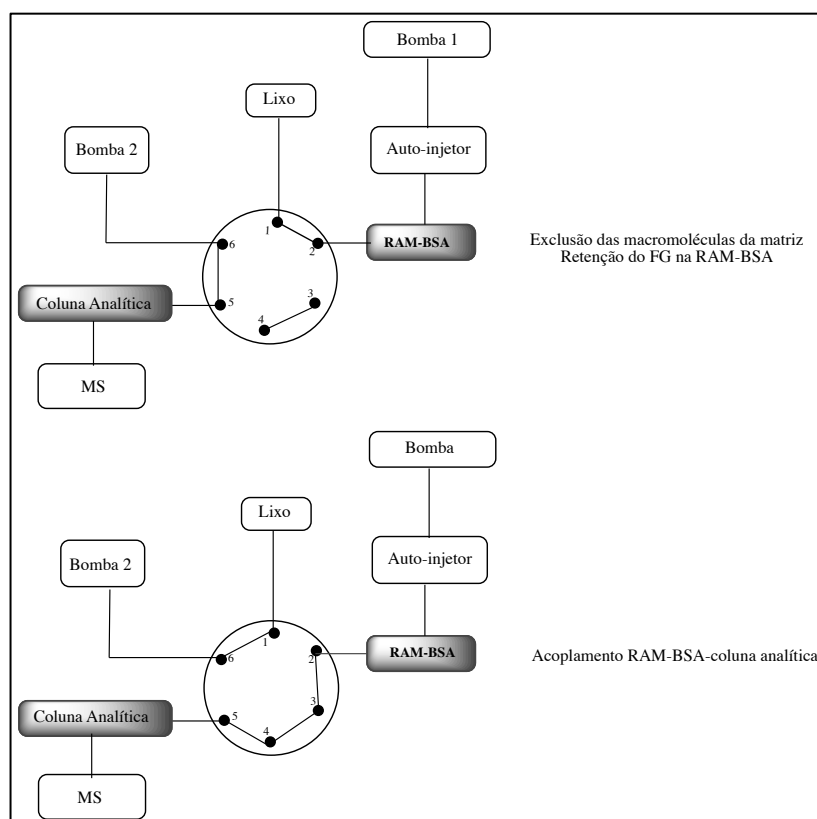


FIGURA 4. 17: Esquema representando o sistema 2D-LC-IT-MS/MS utilizado

As condições de ionização (TABELA 4.8) foram estabelecidas através da inserção direta de solução padrão de FG em água (1 $\mu\text{g/ml}$) no espectrômetro de massa. A fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) operou no modo negativo, e o íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 269 foi isolado e fragmentado, sendo monitorado o íon-produto mais intenso m/z 113. A razão entre os íons m/z 175 e m/z 113 presentes no espectro de massa foi utilizada para a confirmação do FG (FIGURA 4.18).

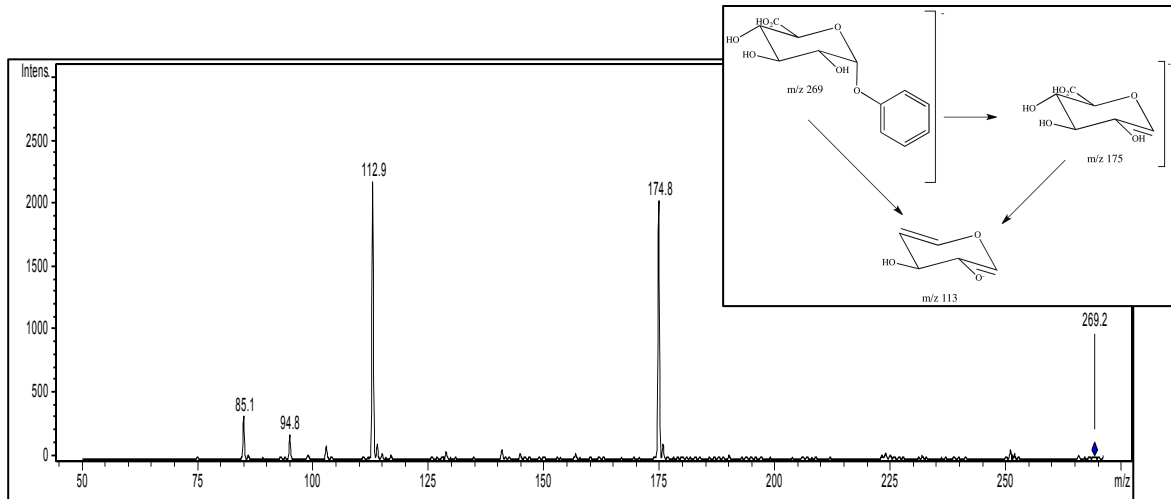


FIGURA 4. 18: Espectro de massa obtido para o FG no *ion trap*

TABELA 4. 8: Condições de ionização otimizadas para o FG no sistema LC-IT-MS/MS

Voltagem do capilar (KV)	4,64
Pressão do gás de nebulização (psi)	30,0
Temperatura de dessolvatação (°C)	325
Vazão do gás de dessolvatação (L/hr)	900
Amplitude de fragmentação (V)	1,00
Target ^a	50000
Max. Accu. Time ^b (ms)	200

^a Quantidade de íons acumulados no *ion trap*; ^b Tempo máximo de acúmulo de íons

Comparando-se o cromatograma obtido após acoplamento com o obtido somente na coluna RAM-BSA, ambos referentes à injeção de urina fortificada (7 µg/mL), notou-se diminuição do sinal analítico referente à determinação do FG (FIGURA 4.19).

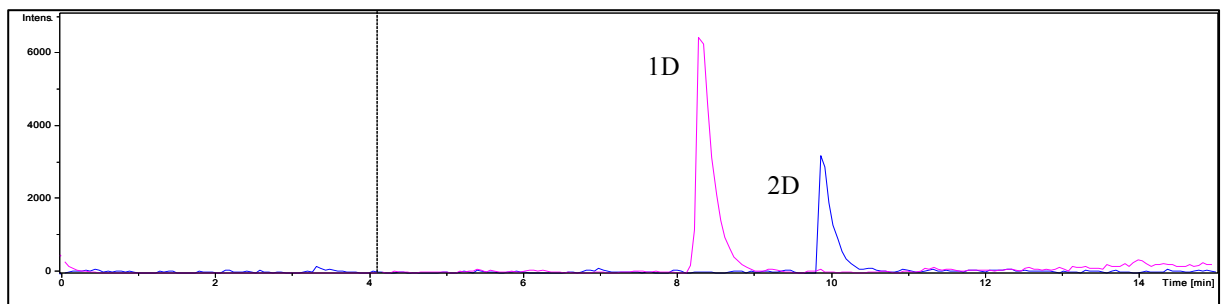


FIGURA 4. 19: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 – comparação entre a intensidade do sinal do FG antes e após acoplamento - sistema LC-IT-MS/MS

Isso pode estar associado a alguns fatores. Pode-se inferir que a transferência do FG para a segunda dimensão foi incompleta, pois o intervalo de acoplamento estabelecido não foi adequado. Outra explicação refere-se ao efeito de matriz na primeira dimensão, o que pode ter ocasionado o aumento (*enhanced*) do sinal analítico do FG quando somente a coluna RAM foi empregada. Por fim, deve-se considerar, ainda, a possibilidade de interferentes transferidos com o FG terem ocasionado efeito de matriz, levando à diminuição do sinal do analito.

Diante dessas hipóteses, decidiu-se investigar o MeOH como modificador orgânico na fase móvel da primeira dimensão e o quanto este poderia contribuir para minimizar o efeito de matriz. Estudou-se a variação de 50% a 80% na proporção de MeOH combinado com formiato de amônio 10 mM pH 2,0, injetando-se urina fortificada com FG (7 µg/mL). Como é possível observar nos cromatogramas da FIGURA 4.20, o metanol proporcionou diferente seletividade para o método, sendo possível separar interferentes do analito de interesse. Assim, a fase móvel selecionada na primeira dimensão foi 50% de metanol em formiato de amônio 10 mM pH 2, pois possibilitou melhor separação dos interferentes em relação à banda do FG.

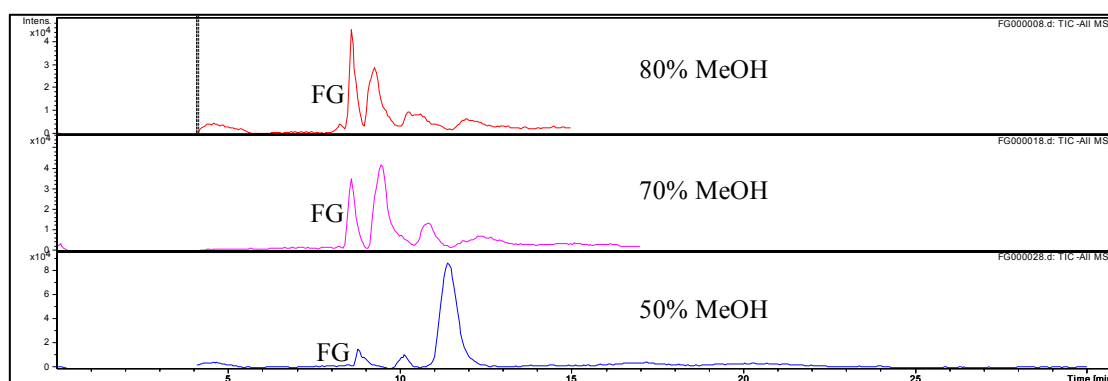


FIGURA 4. 20: Cromatograma de íons totais – metanol como modificador orgânico - sistema LC-IT-MS/MS

Em relação à fase móvel da segunda dimensão, optou-se por também utilizar metanol como modificador orgânico, porém na proporção de 60%, composição esta mais forte que a utilizada na primeira dimensão, o que diminui a possibilidade de alargamento da banda cromatográfica, após o acoplamento. As condições desenvolvidas para a análise de FG em urina estão descritas na TABELA 4.9, e na FIGURA 4.21 observa-se cromatograma nas condições definidas.

TABELA 4. 9: Condições cromatográficas – coluna RAM BSA C₈ x Ascentis Express F5; Vazão: 0,2 mL/min, volume de injeção: 20 µL

Tempo (min)	Água + 0,1 % AF (%)	MeOH	Formiato de Amônio pH 2,0	Evento
0,00 - 4,00	100	0	0	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 – 9,8	0	50	50	Eluição do glucuronídeo
8,30-9,80	0	50	50	Acoplamento entre as colunas
9,80 – 17,0	100	0	0	Recondicionamento da coluna RAM
9,80-17,0	0	60	40	Análise do FG na coluna Ascentis Express F5

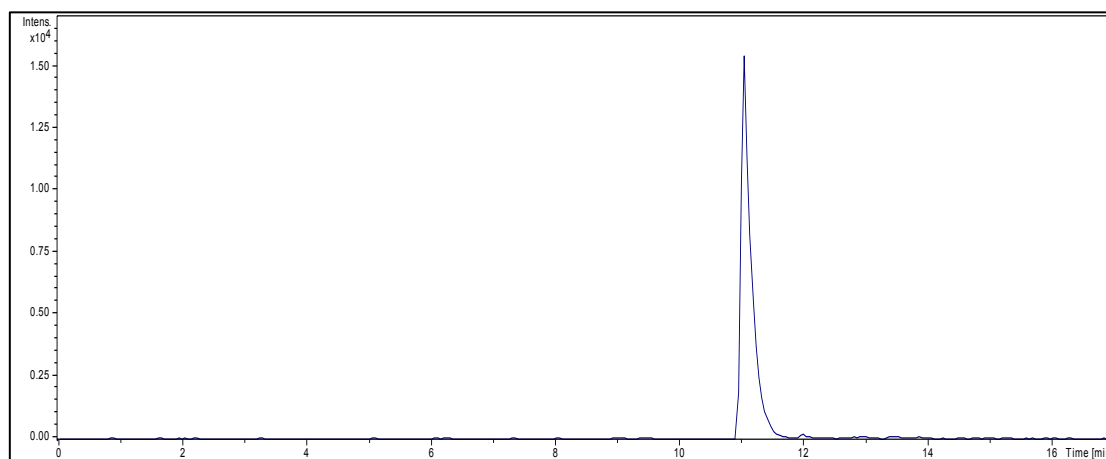


FIGURA 4. 21: Cromatograma de íons extraídos m/z 113 - FG em condições de acoplamento - sistema LC-IT-MS/MS

Validação

O método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios aceitos internacionalmente^{62,128}, tendo os seguintes parâmetros avaliados: seletividade, efeito de matriz (EM), recuperação (RE), eficiência do processo (EP), linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão e estabilidade. Os controles de qualidade foram estabelecidos nas seguintes concentrações: 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (controle baixo), 6,0 $\mu\text{g/mL}$ (controle médio) e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ (controle alto).

Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se injeções individuais das seis urinas que compunham o *pool* de amostra com a matriz fortificada com FG (1,0 $\mu\text{g/mL}$). Os cromatogramas estão apresentados na FIGURA 4.22. Pode-se observar que, nos cromatogramas referentes às urinas brancas, foi detectado um interferente que coeluiu com o FG.

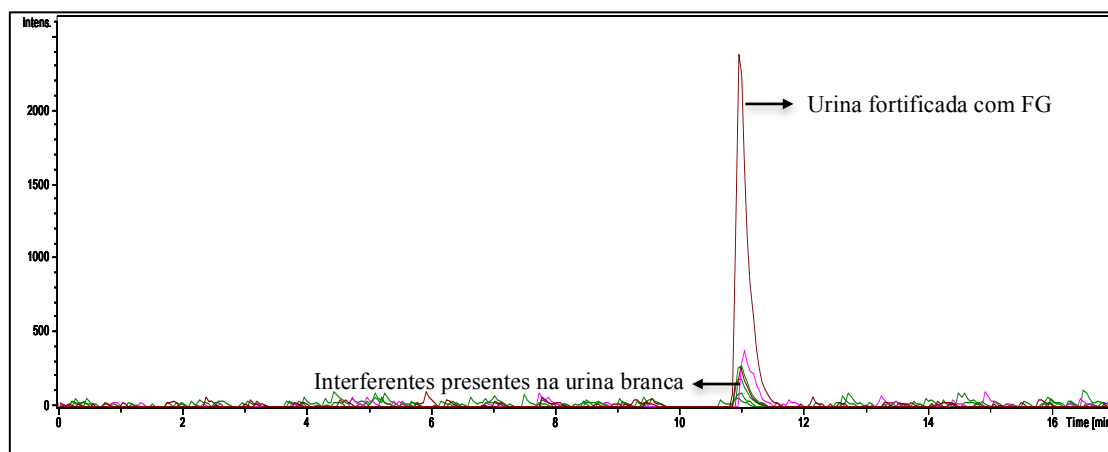
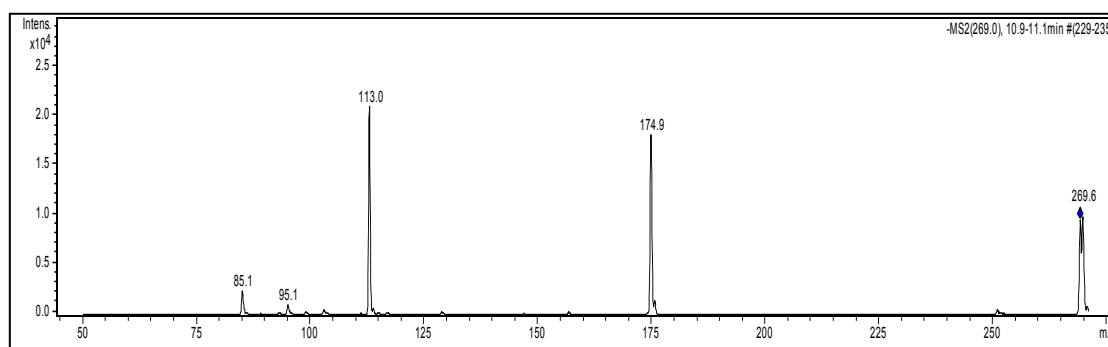


FIGURA 4. 22: Cromatogramas de íons extraídos m/z 113 – Comparação entre urinas brancas e urina fortificada com FG (1,0 $\mu\text{g/mL}$) - sistema LC-IT-MS/MS

Na literatura, encontram-se relatos de que o FG pode ser produzido no corpo humano por meio da metabolização de determinados alimentos, como aspargos, tubérculos, azeite de oliva, dentre outros.^{129,130} Portanto, é de se esperar a presença de interferente, em baixa intensidade, coeluinto com o FG adicionado no *pool* de urinas. Na FIGURA 4.23, o item A corresponde ao espectro de massa do padrão de FG em água. No item B, tem-se o espectro de massa obtido para o interferente detectado no cromatograma da urina branca. Nota-se que o espectro do interferente apresenta alguns íons característicos do FG (m/z 112,7; m/z 174,9; m/z 269). Contudo, como a área do interferente se apresentou menor que 20% em relação à área correspondente ao LQ (1,0 $\mu\text{g/mL}$), seguindo critério preconizado pela EMA (*European Medicines Agency*)⁶², o método foi considerado seletivo.

A)



B)

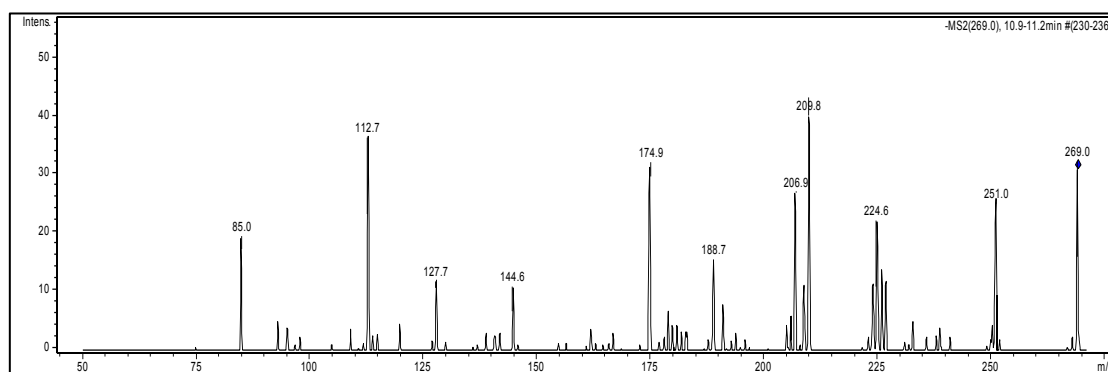


FIGURA 4. 23: A) Espectro de massa referente ao FG em água B) Espectro de massa referente à urina branca

Efeito de Matriz

A urina contém diversos componentes que podem levar à ocorrência do EM, especialmente a grande quantidade de sais e endógenos, o que pode acarretar resultados errôneos, devido à supressão ou ao aumento da ionização do analito de interesse. Neste método, o EM qualitativo foi avaliado por meio de infusão pós-coluna do FG em água na concentração de 7 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a urina *pool*, a urina artificial e a água foram injetadas no LC, passando pela coluna RAM-BSA C₈, de acordo com o esquema apresentado na FIGURA 4.24.

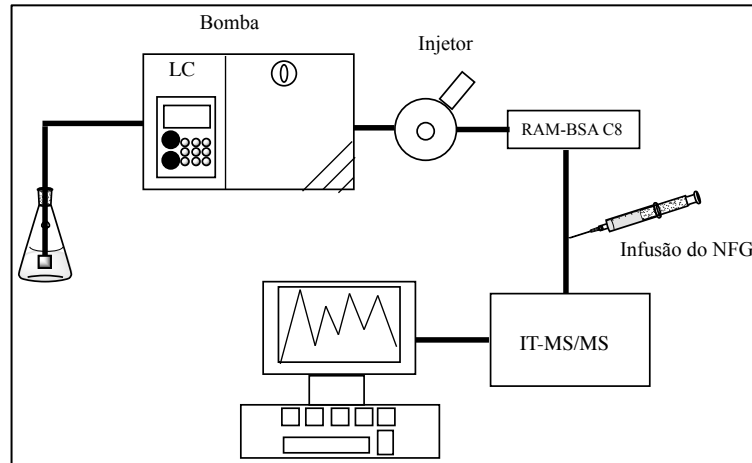


FIGURA 4. 24: EM qualitativo - Infusão pós-coluna

Pode-se observar, nos cromatogramas ilustrados na FIGURA 4.25, que somente para o *pool* de urina houve supressão de ionização no tempo de retenção do FG. Como na urina artificial não houve supressão e partindo-se do princípio de que todos os componentes da urina estão presentes também na urina artificial, exceto os endógenos, pode-se inferir que estes são os principais responsáveis pelo efeito de matriz observado.

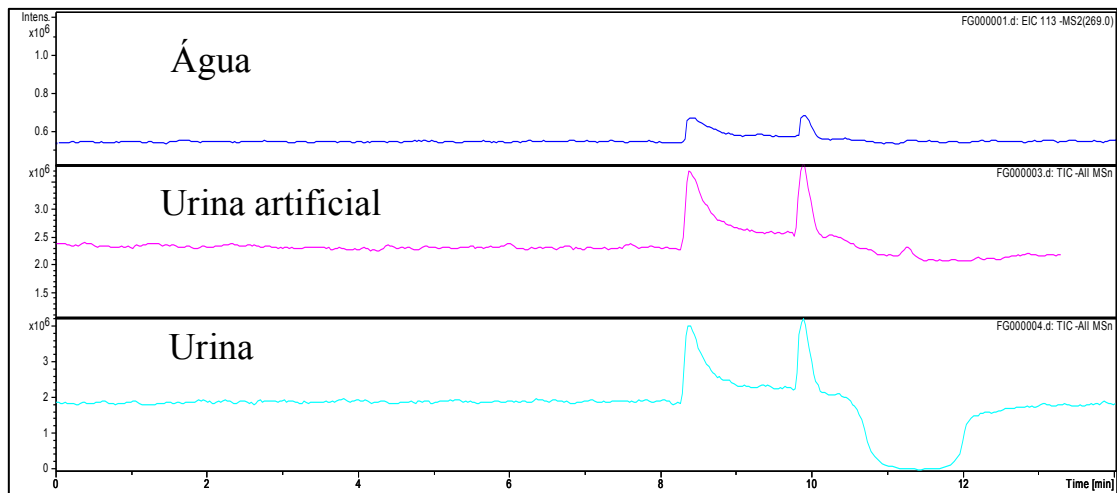


FIGURA 4. 25: Cromatograma de íons totais - Efeito de matriz qualitativo para o FG

Em relação ao EM quantitativo, o protocolo publicado pela EMA (*European Medicines Agency*)⁶² foi adotado como referência.

Segundo a EMA, a variabilidade de resposta entre lotes de matriz deve ser avaliada pela análise de seis lotes de matriz fortificada nos níveis de concentração dos controles baixo e alto e o coeficiente de variação deve ser $\leq 15\%$. Seguindo este protocolo, fortificou-se a amostra de urina branca de seis indivíduos (três mulheres e três homens), nos níveis do CQB e CQA. O coeficiente de variação (CV) foi calculado entre tais amostras. Os resultados estão sumarizados na TABELA 4.10.

TABELA 4. 10: Efeito de matriz segundo preconizado pela EMEA

Amostras	Efeito de matriz FG (CV % entre os 6 lotes de urina)	
	CQB	CQA
Amostras totais (n = 6)	52,5	40,8
Amostras de mulheres (n = 3)	21,1	21,5
Amostras de homens (n = 3)	16,2	18,2

Pode-se observar que, quando se compararam as amostras de homens e mulheres, o CV encontrado ficou acima do permitido ($\leq 15\%$). Quando as amostras foram comparadas por sexo, separando-se mulheres de homens, o CV diminuiu consideravelmente. Para avaliar o efeito de dieta, sexo ou diluição, um número maior de amostras se faria necessário em contradição ao preconizado pela EMA para injeção direta de amostra.

Linearidade

Na sequência, a linearidade do método foi estudada. Uma curva em triplicata, tratada por regressão linear, foi construída na matriz, na faixa de 1,00-13,0 $\mu\text{g/mL}$, com sete níveis de concentração. A curva, o coeficiente de determinação obtido, bem como a equação da reta estão

representados na FIGURA 4.26.

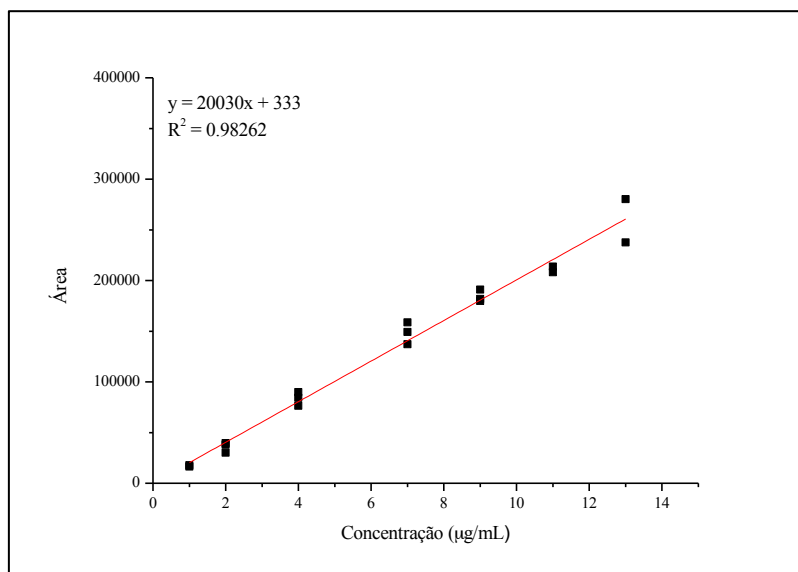


FIGURA 4. 26: Curva de calibração para o FG em urina

A exatidão da curva foi calculada, estando dentro do limite de 80,0-120% para o LQ e 85,0-115% para as demais concentrações. O coeficiente de variação entre as curvas (CV) variou entre 5,81-14,1%, estando de acordo com o preconizado pelos protocolos internacionais de validação.^{62,128} O limite de quantificação (LQ) para este método foi de 1,00 µg/mL, e o de detecção (LD) foi de 0,50 µg/mL.

Precisão e Exatidão

Avaliou-se a precisão intralote calculando-se o CV (%) entre as quintuplicatas preparadas em cada lote e também interlotes, calculando-se o CV (%) entre a média das áreas obtidas em cada um dos três lotes de controle de qualidade. Os dados estão apresentados na TABELA 4.11. Todos os lotes e também a média dos mesmos apresentaram precisão, pois o CV calculado foi menor que 15%.

A exatidão foi calculada intralote, sendo a média das áreas das quintuplicatas interpolada na equação da reta referente à curva de calibração, e tal valor foi comparado com o valor nominal do controle de qualidade. Para calcular a exatidão interlotes, fez-se a média das áreas obtidas em todos os lotes, para cada nível de concentração. Este valor foi interpolado na equação da reta e comparado com o valor nominal do controle de qualidade. A exatidão intra e interlote ficou dentro da faixa de 85,0%-115%, conforme especificado pelos guias de validação internacionais.^{62,128}

TABELA 4. 11: Precisão e exatidão intra e interlote (n = 5)

FG (µg/mL)	1° Lote		2° Lote		3° Lote		Média dos 3 lotes	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
3,50	91,3	7,81	99,4	6,38	99,5	15,7	96,7	4,87
6,00	109	3,50	108	5,14	108	6,38	108	0,45
8,00	115	3,09	112	3,27	107	10,9	111	3,66

Estabilidade

A estabilidade no autoinjeter foi avaliada a partir da análise de um lote de controle de qualidade em cada nível de concentração (baixo, médio e alto) assim que preparado (t0) e após 24 horas (t24) do preparo, armazenado em temperatura ambiente. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.12, e pode-se observar que as amostras são estáveis por 24 horas em temperatura ambiente.

TABELA 4. 12: Estabilidade de autoinjeter para o FG - temperatura ambiente

Amostra	Exatidão (%)	
	t0	t24
CQB	91,3	86,9
CQM	109	109,3
CQA	115	116

Na sequência, foi avaliado o degelo. Um lote de controle foi preparado, em cada nível de concentração, e analisado imediatamente (Dt0). Na sequência, cada lote foi congelado por 48 hrs e depois degelado e analisado (Dt48). Os resultados estão descritos na TABELA 4.13. Somente para o CQB a exatidão encontrada estava fora da faixa especificada de 80,0 -120%, após 48 horas de congelamento. Assim, recomenda-se que as amostras sejam preparadas e analisadas, não sendo congeladas após preparo.

TABELA 4. 13: Degelo para o FG – ciclo de 48 horas a - 20 °C

Amostra	Exatidão	
	Dt0	Dt24
CQB	81,1	74,3
CQM	86,7	95,5
CQA	108	105

Aplicação do método

O método foi aplicado em oito indivíduos que se submeteram a exames clínicos para avaliar fenol urinário no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi, situado na cidade de São Carlos. As amostras dos indivíduos foram quantificadas por padronização externa frente à curva de calibração preparada a partir da fortificação do *pool* de urina utilizado na

validação do método. Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 4.14.

TABELA 4. 14: Análise de urinas individuais por padronização externa

Indivíduo	FG (µg/mL)
1	< LQ
2	< LQ
3	< LQ
4	1,08
5	2,53
6	12,1
7	< LQ
8	< LQ

Levando em consideração os resultados de EM obtidos onde ficaram evidenciadas as diferenças de amostras individuais em relação ao *pool* de urina usado como matriz, para avaliar a exatidão dos resultados obtidos, a padronização por adição de padrão foi empregada para as amostras dos indivíduos com valores FG acima do LQ por calibração externa.

Quando se realiza quantificação por adição de padrão, diferentes concentrações do padrão analítico são adicionadas em uma amostra que já contém o composto de interesse, e uma curva analítica é construída a partir destas amostras. Graficamente, extrapolando a curva no eixo x, encontra-se a concentração inicial do analito na amostra (FIGURA 4.27). Dessa forma, a variação na composição da urina de cada indivíduo é levada em consideração⁶³, já que a curva é construída individualmente.

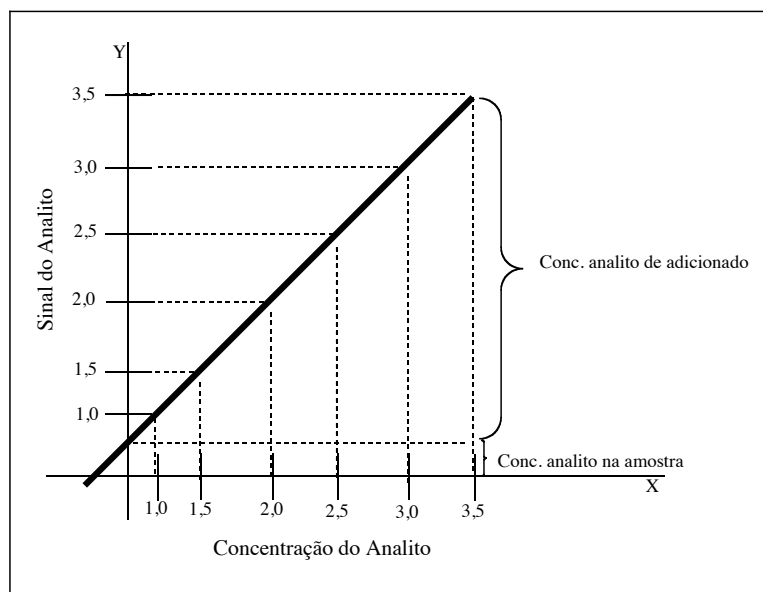


FIGURA 4. 27: Exemplo de curva por adição de padrão

Assim, a faixa de padrão adicionada foi de 1,00 a 5,00 $\mu\text{g/mL}$, e as amostras analisadas foram: 4, 5 e 6. Para a amostra 6, como o valor de FG encontrado por padronização externa estava próximo ao ponto máximo da curva, diluiu-se esta amostra 20 vezes antes de adicionar os padrões. Para checar a exatidão da calibração por adição de padrão, preparou-se também uma amostra-padrão com o *pool* de urina na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.15.

TABELA 4. 15: Análise de urinas individuais e da amostra-padrão de *pool* fortificado - calibração por adição de padrão

Indivíduo	FG ($\mu\text{g/mL}$)	Creatinina (mg/dL)	FG (mg/g creatinina)
4	1,14	166	0,69
5	0,61	41,6	1,46
6	22,3	15,6	141
<i>Pool</i>	2,05	83,5	2,46

A amostra-padrão de *pool* de urina fortificada apresentou exatidão de 102%. Os resultados para as amostras 5 e 6 diferem em relação ao obtido por padronização externa, certamente devido à variação da composição individual da urina.

Assim, pode-se concluir que o *pool* de urina como matriz, com calibração externa pode ser utilizado para triagem de amostras. Exatidão da quantificação é conseguida por calibração por adição de padrão.

4.2. Quantificação de *p*-nitrofenil- β -D-glucuronídeo em urina por injeção direta de amostra por 2D-LC-MS/MS

Devido aos problemas relacionados à seletividade encontrados na análise de FG no QqQ, decidiu-se estudar o comportamento de outro glucuronídeo em condições semelhantes às utilizadas para o FG, sendo o *p*-nitrofenil- β -D-glucuronídeo (NFG) selecionado.

4.2.1. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema UHPLC-QqQ para o NFG

Ajuste das condições cromatográficas

Assumindo condições cromatográficas similares para o NFG e FG, as colunas para primeira e segunda dimensões foram mantidas, assim como a diluição da urina. O esquema do sistema de acoplamento UHPLC-QqQ é aquele mostrado na FIGURA 4.9. As condições de fase móvel nas duas dimensões assim como o tempo de acoplamento, no entanto, foram ajustados.

Assim, a exclusão das macromoléculas da urina foi avaliada, e o tempo de exclusão obtido foi de 4 min. Como fase móvel de eluição e transferência do NFG da coluna RAM-BSA para a coluna analítica BEH-Fenil, utilizou-se uma mistura de ACN e água, contendo 0,1% de ácido fórmico. O percentual de ACN como modificador orgânico foi avaliado (FIGURA 4.28), levando-se em consideração o tempo de exclusão das macromoléculas da urina, por meio da injeção de padrão de NFG em água (500 ng/mL). Em todos os percentuais avaliados, o NFG ficou retido na coluna durante o tempo de exclusão das macromoléculas da urina, sendo então o percentual de 70% de ACN selecionado.

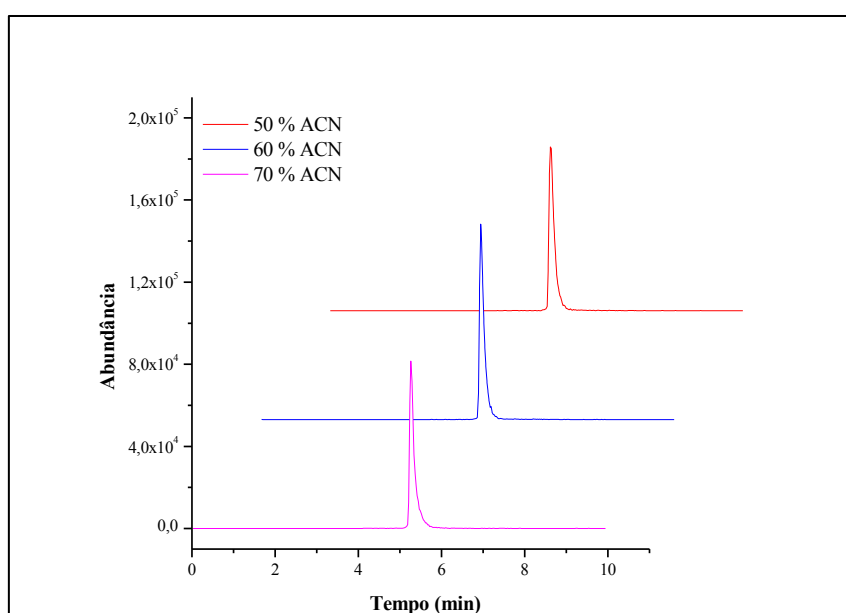


FIGURA 4. 28: Cromatograma de íons totais referente à variação do percentual de ACN como modificador orgânico na fase móvel de transferência (ACN + 0,1% AF/água + 0,1% AF); ESI⁻; SRM, m/z 314,2 \rightarrow 138,0 e m/z 314,2 \rightarrow 112,9

Na segunda dimensão, a fase móvel utilizada foi a mesma da primeira dimensão. Na TABELA 4.16, estão sumarizadas as condições cromatográficas desenvolvidas para o NFG.

TABELA 4. 16: Condições empregadas no acoplamento entre RAM BSA C₈ x BEH Fenil - NFG, volume de injeção: 10 µL, vazão: 0,3 mL/min

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água + 0,1 % /AF ACN	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
5,01 - 7,00	água + 0,1 % /AF ACN + 0,1 % AF	30:70	Eluição do glucuronídeo
6,10-7,00	água + 0,1 % /AF ACN + 0,1 % AF	30:70	Acoplamento entre as colunas
7,01 - 15,00	água + 0,1 % AF/ACN	99:1	Recondicionamento da coluna RAM
7,01 - 15,00	água + 0,1 % /AF ACN + 0,1 % AF	30:70	Análise do NFG na coluna BEH-Fenil

Sistema 2D-LC-MS/MS

As condições de ionização e fragmentação do NFG foram otimizadas, por meio de inserção direta no sistema MS, combinando-se a vazão vinda da bomba-seringa contendo solução-padrão de NFG em água (1 µg/mL) com a vazão vinda do LC, (ACN/ solução aquosa de ácido fórmico 0,1% 60:40 v/v). Para selecionar as transições que seriam monitoradas, levaram-se em consideração dois fatores, concomitantemente: informações da literatura que demonstram a fragmentação típica de glucuronídeo e intensidade dos íons-produtos. Baseando-se nessas informações, selecionou-se a transição m/z 314 \rightarrow 138, correspondente à aglicona, e a m/z 314 \rightarrow 113 que corresponde à fragmentação do ácido glucurônico. Na FIGURA 4.29, tem-se um esquema demonstrando a estrutura do NFG e seus íons-fragmentos mais intensos. Na TABELA 4.17,

estão sumarizadas as condições de ionização e fragmentação estabelecidas para o NFG.

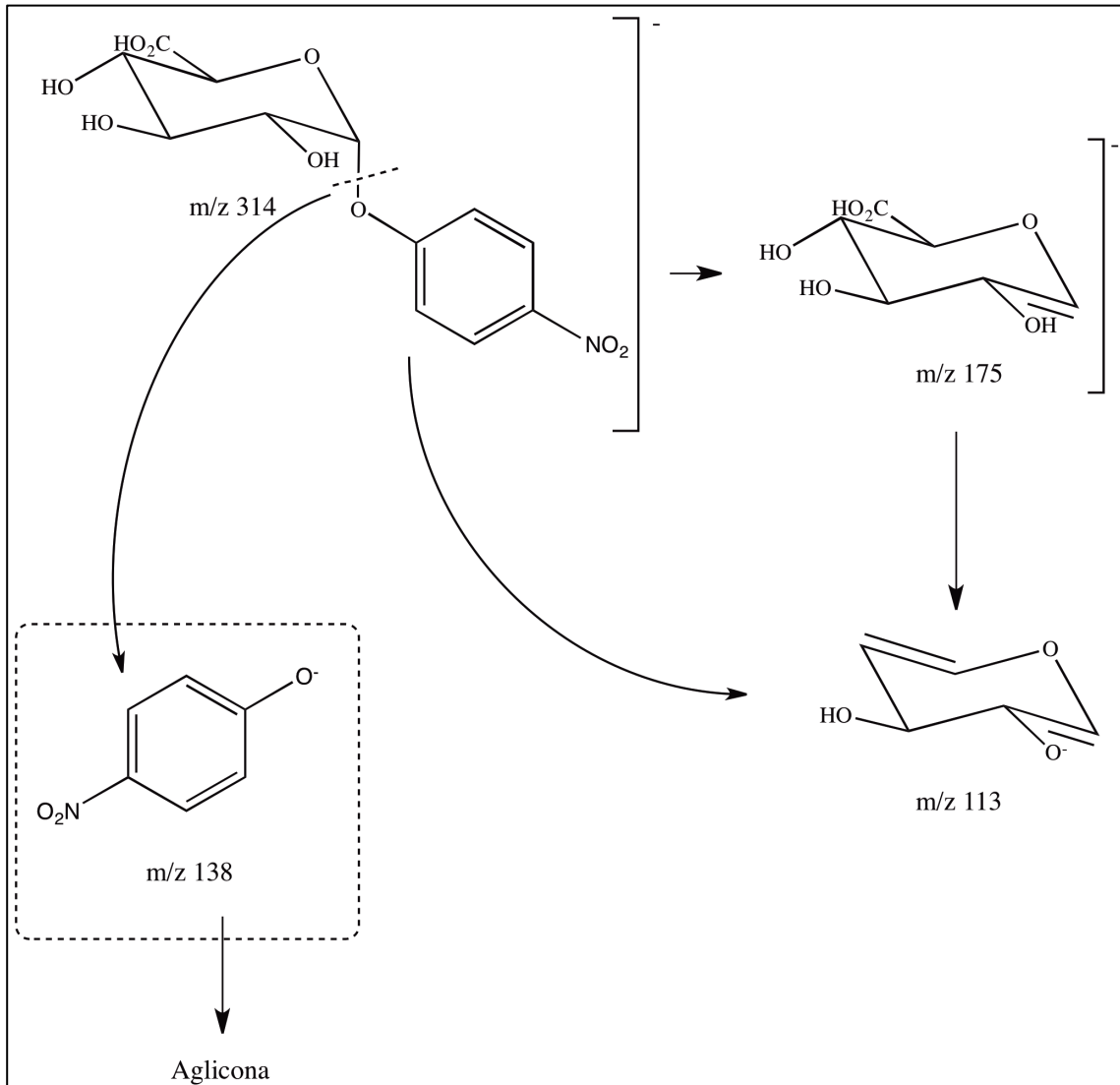


FIGURA 4. 29: Estrutura do NFG e seus íons-fragmentos

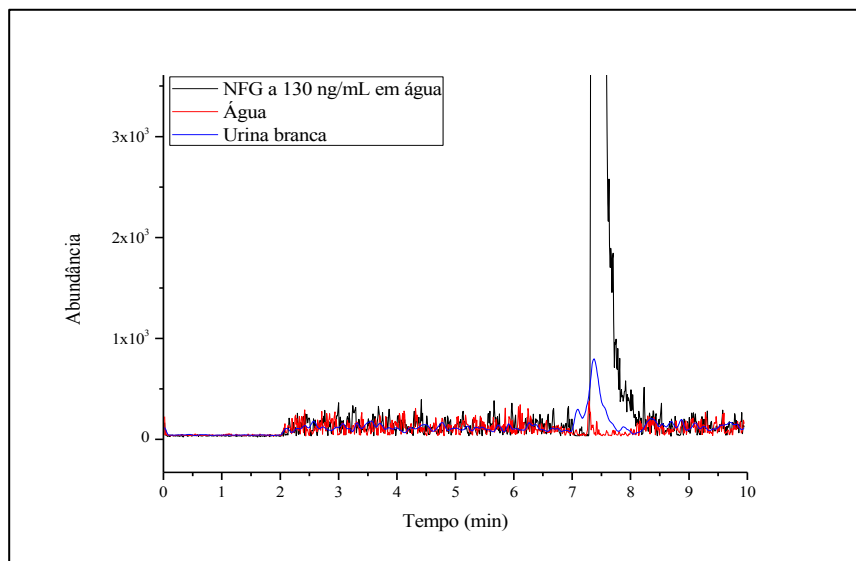
TABELA 4. 17: Condições de ionização e fragmentação para NFG por ESI

Parâmetros de ionização	Íon-precursor (m/z) [M-H]⁻	Transição SRM (m/z)	Energia de Colisão (eV)
Capilar: 2 kV Cone: 18 V	314,2	138,0	24
Temperatura de dessolvatação: 500 °C Gás de dessolvatação: 1000 L/hr		112,9	14

Tendo estabelecido as condições analíticas iniciais, avaliou-se a seletividade. No item A) da FIGURA 4.30, observam-se os cromatogramas da análise de água fortificada com NFG (130 ng/mL), água pura e urina branca. Uma banda foi detectada na urina branca com o mesmo tempo de retenção do NFG e nas mesmas transições, evidenciando que, nas condições desenvolvidas, não houve seletividade.

No item B) da FIGURA 4.30, observam-se os cromatogramas da avaliação de seletividade das condições analíticas desenvolvidas para o FG. Comparando-se os cromatogramas dos itens A e B, observa-se que o interferente detectado na urina branca na análise de NFG é bem menos intenso do que o detectado na análise de FG. Esta evidência pode estar relacionada com o fato de o NFG não ser produzido por metabolismo de alimentos, ao contrário do que ocorre com o FG. No entanto, embora o sinal do interferente encontrado na urina branca na análise de NFG seja pouco intenso, este foi considerado e investigado, inclusive em relação a “efeito memória”.

A)



B)

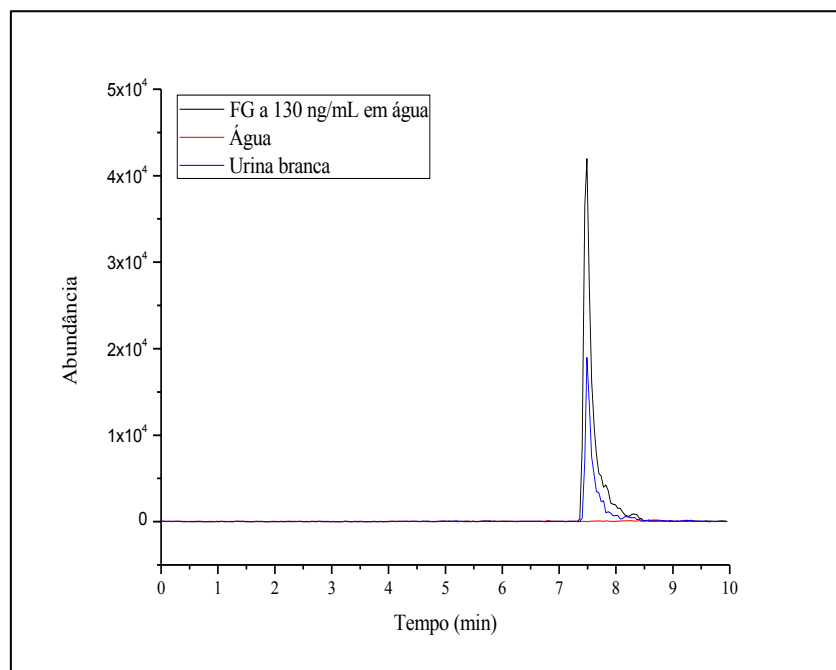


FIGURA 4. 30: Cromatogramas de íons totais referentes à: A) Análise de água fortificada com NFG, água pura e urina branca. B) Análise de água fortificada com FG, água pura e urina branca; ESI; SRM, m/z 314,2 \rightarrow 138,0 e m/z 314,2 \rightarrow 112,9

Para melhor avaliar a seletividade e descartar a possibilidade de “efeito memória” na análise do NFG em urina, realizou-se uma comparação entre a matriz biológica e uma matriz produzida artificialmente

(Urisub[®] CST Technologies, INC.). Ambas possuem composição química semelhante, porém a artificial é livre de interferentes endógenos. Dessa forma fortificou-se a urina artificial com NFG (130 ng/mL) e injetou-se no sistema cromatográfico, seguido de injeção da urina artificial em branco. Na FIGURA 4.31, ilustram-se os cromatogramas obtidos, sendo possível notar que nenhuma banda foi detectada na urina artificial branca e, assim, descartando, contaminação por “efeito memória”. Esse resultado evidencia, também, que os picos detectados no tempo de retenção e nas mesmas transições do NFG na urina humana correspondem a endógenos ou xenobióticos.

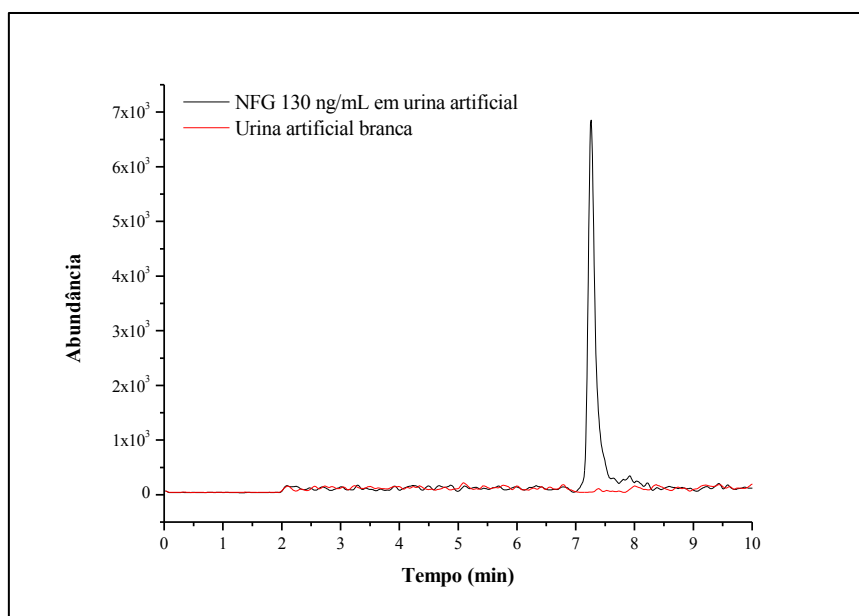


FIGURA 4. 31: Cromatogramas de íons totais obtidos para o padrão de NFG em urina artificial a 130 ng/mL e injeção de urina artificial branca; ESI; SRM, m/z 314,2 \rightarrow 138,0 e m/z 314,2 \rightarrow 112,9

Para investigar sobre a natureza dos interferentes, experimentos de perda neutra (NL) foram realizados. Considerando que xenobióticos são excretados como glucuronídeos, avaliou-se a perda da m/z 176 Da.¹³¹ Para tanto, um *pool* de urina branca foi analisado nas condições

cromatográficas descritas na TABELA 4.16. O cromatograma de íons totais obtidos (FIGURA 4.32) apresenta uma banda em 7,32 min, tempo de retenção próximo ao obtido para o NFG (7,25 min) no modo SRM.

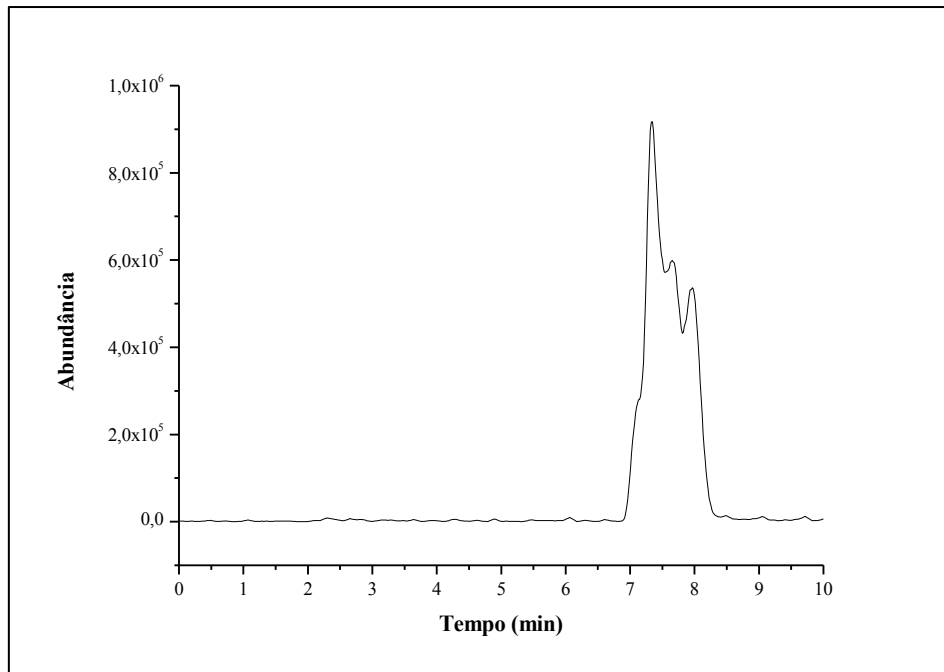


FIGURA 4. 32: Cromatograma de íons totais obtidos para a urina branca no experimento de perda neutra (176 Da)

O espectro de massa correspondente a esta banda mostrou diversos íons com perda de 176 Da.

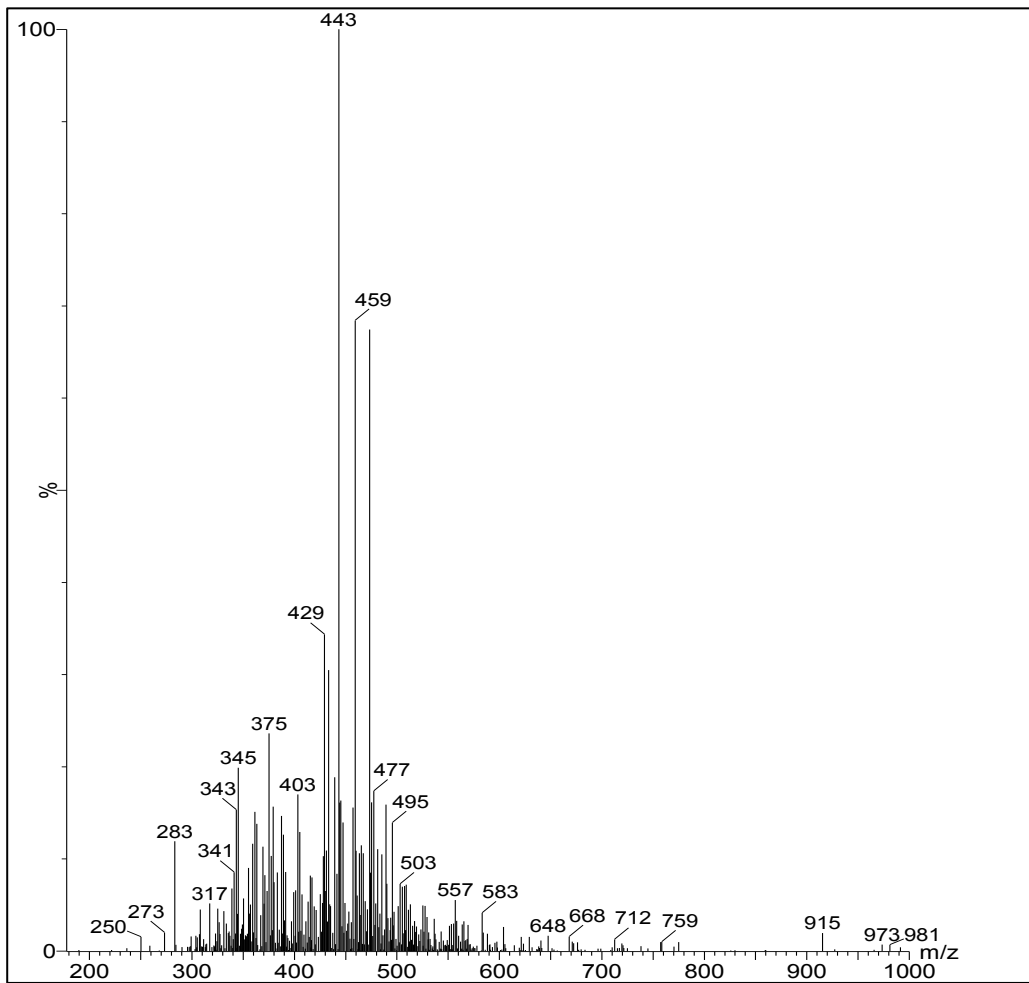


FIGURA 4. 33: Espectro de massa da banda detectada na urina branca (7,32 min) no experimento de perda neutra

Extraíndo-se os íons mais intensos, observaram-se, nos cromatogramas correspondentes, bandas em tempo de retenção próximo ao do NFG (FIGURA 4.33). Assim pode-se concluir que outros glucuronídeos coeluem com o NFG.

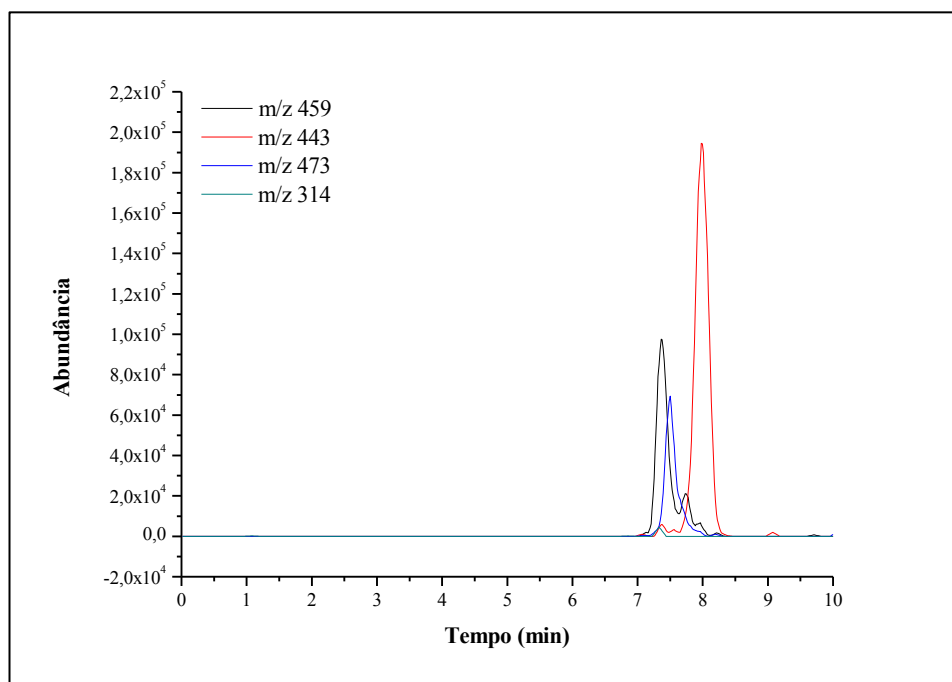


FIGURA 4. 34: Experimento de perda neutra: íons extraídos, cone 18 V, capilar 2 KV, m/z 178 a m/z 1000 Da, energia de colisão de 22 eV.

Dessa forma, com a finalidade de se atingir a seletividade cromatográfica empregou-se a coluna ZIC-HILIC na segunda dimensão, substituindo-se a coluna BEH-Fenil.

A cromatografia por interação hidrofílica (HILIC) é considerada complementar ao modo reverso de eluição¹³², proporcionando diferente seletividade em relação aos compostos polares. Neste modo de eluição, a fase estacionária é polar. A fase móvel também é polar, predominantemente orgânica, porém, deve conter um mínimo de 10% de água. Isto é essencial porque a água adsorve na superfície da sílica, formando uma película, e o mecanismo de separação dos analitos é regido pela partição dos mesmos entre o solvente orgânico e a película de água (FIGURA 4.34).¹²⁶

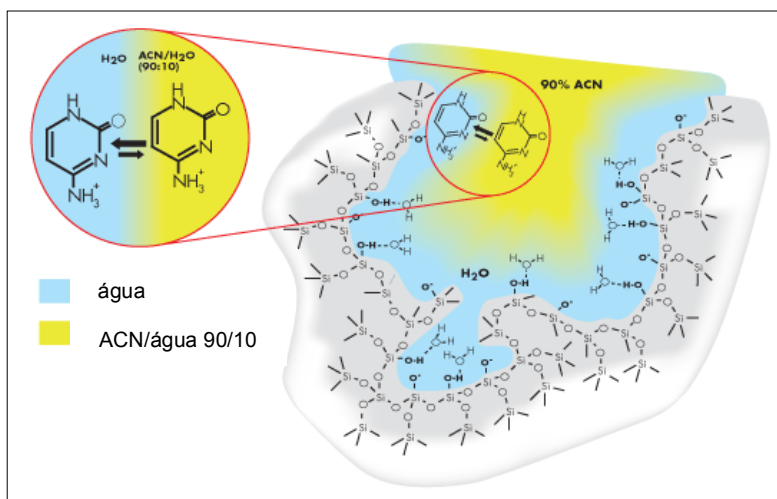


FIGURA 4. 35: Mecanismo de separação no modo HILIC – adaptado da referência¹³³

Diversas colunas com características polares podem ser usadas no modo HILIC. Um exemplo são as colunas ZIC-HILIC, cuja fase estacionária é constituída de sílica porosa tendo um grupo zwitteriônico ligado covalentemente à sílica. Na fase estacionária desta coluna, além do mecanismo de separação por partição, também ocorrem interações eletrostáticas fracas entre os analitos ionizados e a fase zwitteriônica (FIGURA 4.35). Esta característica proporciona seletividade única para a coluna ZIC-HILIC, especialmente para compostos ionizáveis e polares que apresentam baixa retenção em colunas que operam no modo reverso de eluição, tal como os glucuronídeos.¹³⁴

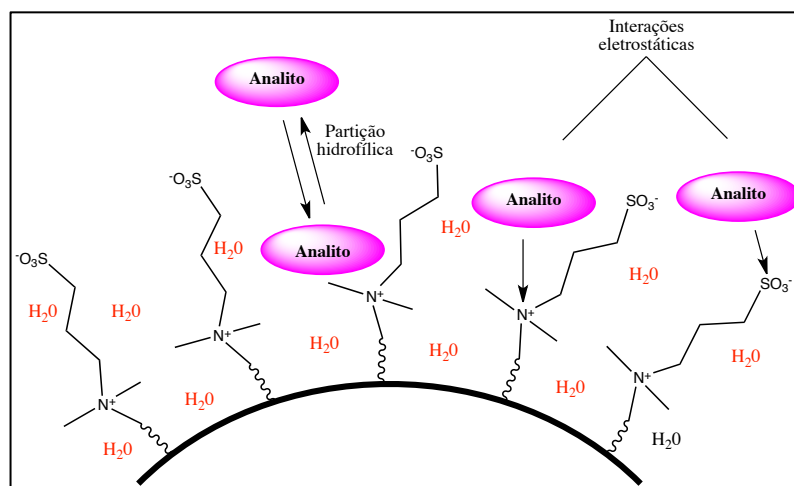


FIGURA 4. 36: Fase estacionária ZIC-HILIC e seu mecanismo de retenção – adaptado da referência¹³⁵

Assim, para poder empregar a coluna ZIC-HILIC na segunda dimensão, as condições analíticas foram ajustadas para o modo HILIC de eluição. Na TABELA 4.18, estão descritas as condições analíticas utilizadas no acoplamento entre as colunas RAM-BSA C₈ e a ZIC-HILIC. Na segunda dimensão, optou-se por utilizar eluição no modo gradiente, a fim de se obter melhor separação do NFG em relação aos interferentes.

TABELA 4. 18: Condições empregadas no acoplamento entre a coluna RAM BSA C₈ x ZIC-HILIC Vazão: 0,3 mL/min

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção	Evento
0,00 - 4,00	água/ACN + 0,1% AF	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 - 6,80	formiato de amônio pH 3/ACN + 0,1% AF	5:95	Eluição do glucuronídeo
5,75-6,80	formiato de amônio pH 3/ACN + 0,1% AF	5:95	Acoplamento entre as colunas
6,80 - 33,0	água/ACN + 0,1% AF	99:1	Recondicionamento da coluna RAM
6,80-26,8	formiato de amônio pH 6,8/ACN + 0,1% AF	Eluição gradiente: 95 % ACN para 5 % ACN	Análise na coluna ZIC-HILIC
26,8-33,0	formiato de amônio pH 6,8/ACN + 0,1 % AF	5:95	Recondicionamento da coluna ZIC-HILIC

Nos cromatogramas da FIGURA 4.36 tem-se a comparação da análise da urina branca em relação às análises das amostras de água e urina artificial, ambas fortificadas com NFG (500 ng/mL). Pode-se observar que uma banda foi detectada na urina branca, coelundo com o NFG, nas mesmas transições, evidenciando que, mesmo com a utilização da coluna ZIC-HILIC, a seletividade não foi alcançada.

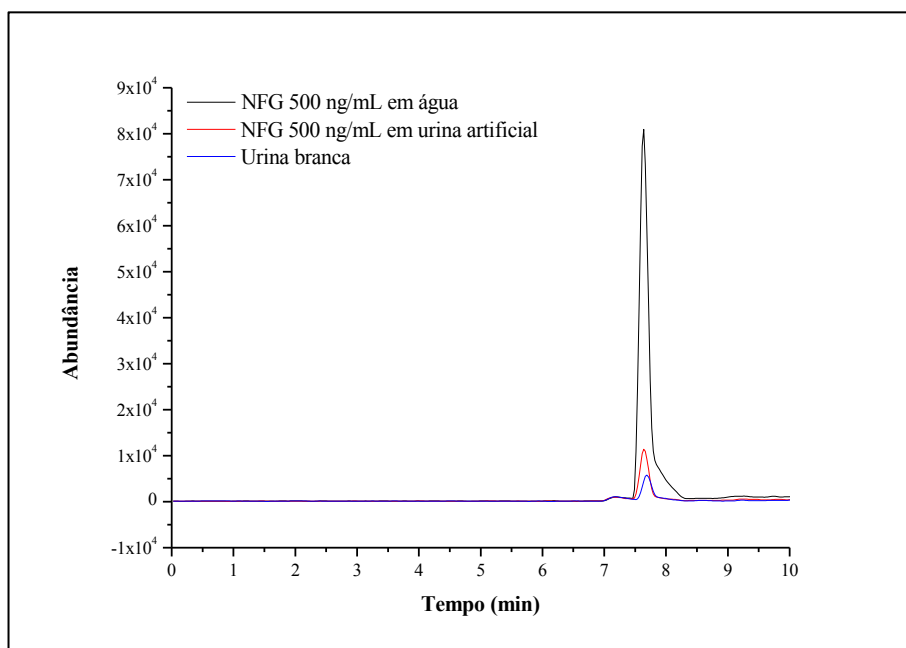
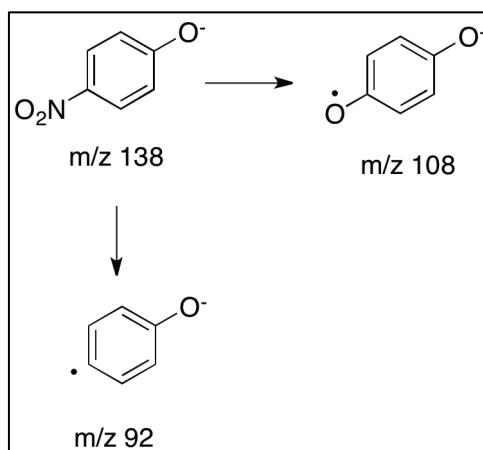


FIGURA 4. 37: Cromatograma de íons totais comparando-se NFG em água (500 ng/mL), NFG em urina (500 ng/mL) e urina branca no acoplamento entre a coluna RAM-BSA C₈ - ZIC-HILIC; ESI; SRM, m/z 314,2 \rightarrow 138,0 e m/z 314,2 \rightarrow 112,9

Considerando que o NFG também é uma molécula pequena, poucas transições estão disponíveis para serem monitoradas. Para dificultar ainda mais, duas (m/z 314 \rightarrow 113; 314 \rightarrow 175) das três transições mais intensas são correspondentes à porção ácido glucurônico da molécula, portanto não específicas. Assim, uma alternativa encontrada para contornar este inconveniente foi gerar o íon m/z 138, correspondente à aglicona, na fonte de ionização e fragmentá-lo na célula de colisão, gerando os íons m/z 108 e 92 Da (FIGURA 4.37).

FIGURA 4. 38: Proposta de fragmentação do íon m/z 138

Para isso, realizou-se um estudo sistemático aumentando-se a energia do cone e do capilar e monitorando-se a intensidade do íon m/z 138. A energia do cone que proporcionou maior intensidade para o íon m/z 138 foi 50 V. Em relação ao capilar, o aumento de sua energia não influenciou na intensidade do íon m/z 138. Estabelecidas as condições para gerar o íon m/z 138 na fonte, otimizaram-se as condições de fragmentação do mesmo, e as condições estabelecidas estão descritas na TABELA 4.19.

TABELA 4. 19: Condições de ionização do NFG sendo o íon precursor o m/z 138

Parâmetros de ionização	Íon- precursor (m/z) [M- H] ⁻	Transição SRM (m/z)	Energia de Colisão (eV)
Capilar: 2 kV Cone: 50 V Temperatura de dessolvatação: 500 °C	138	92,0	20,0
Gás de dessolvatação: 1000 L/hr		108	15,0

Quanto às condições cromatográficas, ajustes foram realizados buscando condições ideais de trabalho da coluna ZIC-HILIC. As condições cromatográficas otimizadas estão descritas na TABELA 4.20. Em relação ao preparo de amostra, inseriu-se, também, uma etapa que consiste na extração líquido-líquido (LLE) da urina com acetato de etila. Este procedimento passou a ser realizado, pois compostos orgânicos presentes na urina se depositavam na fonte de ionização, ocasionando rápida perda de sensibilidade.³⁴

TABELA 4. 20: Condições cromatográficas otimizadas para o acoplamento entre a coluna RAM BSA C₈ x ZIC-HILIC

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água + 0,1% AF/ACN + 0,1 % AF	99:1	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 – 6,30	formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN + 0,1% AF	50:50	Eluição do glucuronídeo
5,70-6,30	formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN + 0,1% AF	50:50	Acoplamento entre colunas
6,30 – 10,00	formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN	50:50	Análise na coluna ZIC-HILIC
6,31 - 10,0	água + 0,1% AF/ACN + 0,1% AF	99:1	Recondicionamento da coluna RAM

Vazão: 0,3 mL/min na primeira dimensão e 0,1 mL/min na segunda dimensão

Avaliou-se a seletividade do método nas novas condições estabelecidas, utilizando-se inicialmente a coluna RAM-BSA C₈ no modo unidimensional, ou seja, operando como coluna extratora e coluna analítica, concomitantemente. No cromatograma da FIGURA 4.38, é

possível observar que, mesmo em uma única dimensão cromatográfica, a seletividade foi alcançada na análise de urina branca, sendo apenas detectados ruídos no tempo de retenção correspondente ao NFG.

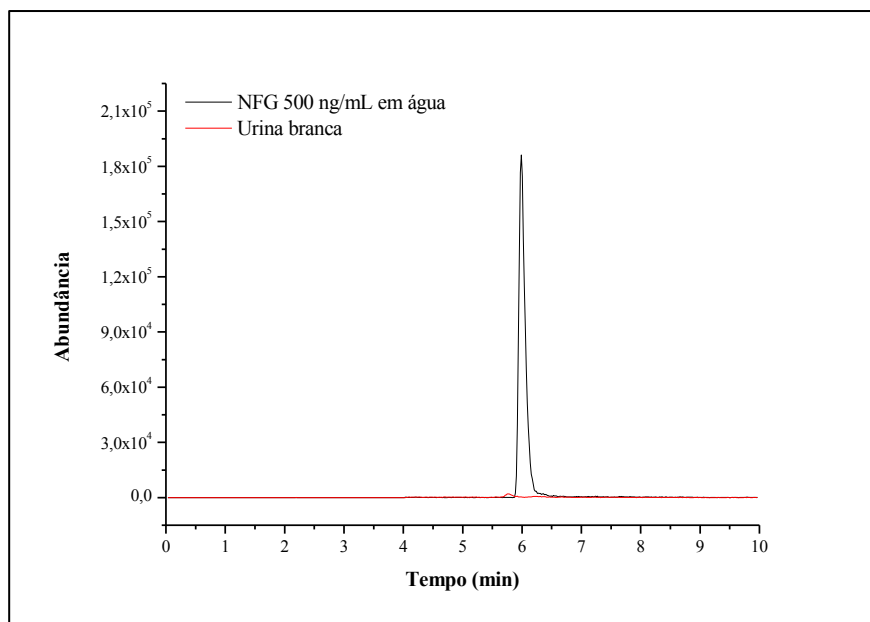


FIGURA 4. 39: Cromatograma íons totais comparando-se análise de NFG em água (500 ng/mL) e urina branca na coluna RAM-BSA C₈; ESI; SRM, m/z 138 \rightarrow 92,0 e m/z 138 \rightarrow 108

No entanto, como o íon-precursor foi gerado na fonte de ionização, para avaliar a possibilidade de problemas de precisão e exatidão devido à inconsistência da fragmentação, avaliou-se a possibilidade de gerar uma curva analítica utilizando-se as transições m/z 138 \rightarrow 108 e 138 \rightarrow 92,0. Para isso, soluções-padrão de NFG, na faixa de 200 a 400 ng/mL, foram preparadas em água a fim de garantir que efeitos de matriz não interferissem no resultado. Para este estudo, realizou-se o acoplamento das colunas RAM-BSA C₈ e ZIC-HILIC, nas condições descritas na TABELA 4.20. Um cromatograma representativo pode ser observado na FIGURA 4.39.

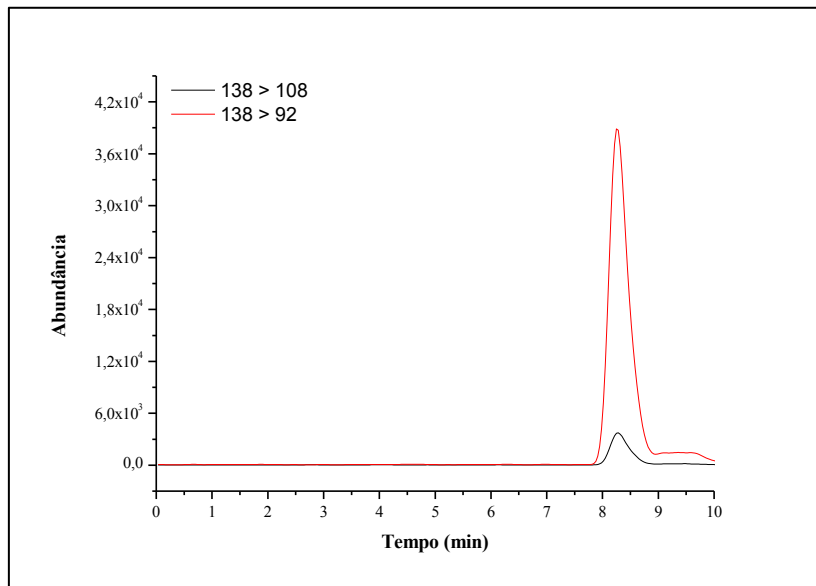


FIGURA 4. 40: NFG 200 ng/mL em água. Acoplamento RAM-BSA C₈ - ZIC-HILIC. SRM-ESI, cone 50 V e capilar 2 KV. Transições consideradas: (138 → 108, 138 → 92,0).

Como pode ser observado no gráfico da FIGURA 4.40, a fragmentação na fonte de ionização do m/z 138 não se mostrou linear à concentração utilizada, sendo que nenhum modelo matemático pode ser empregado para representar o conjunto de dados obtidos, inviabilizando, assim, este procedimento.

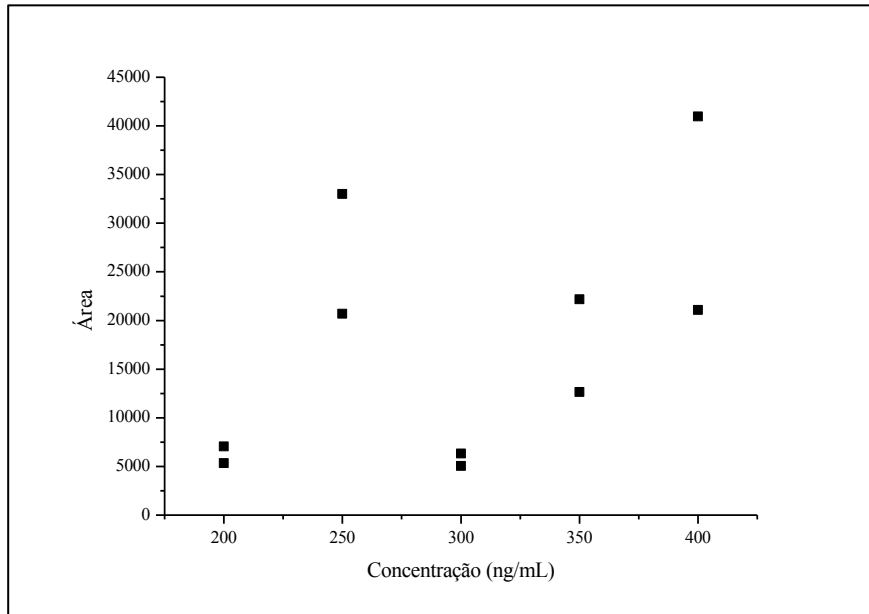


FIGURA 4. 41: Variação da concentração de NFG (200 a 400 ng/mL) em água em relação à área obtida

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que, embora a seletividade tenha sido alcançada com o monitoramento das transições m/z $138 \rightarrow 108$ e $138 \rightarrow 92,0$, não foi possível estabelecer curva analítica.

Desse modo o analisador de massa do tipo *ion trap* foi considerado na análise do NFG.

4.2.2. Desenvolvimento do método utilizando-se sistema LC-IT-MS/MS para o NFG

Sistema LC- MS/MS

O sistema utilizado foi um LC acoplado a um analisador de massa do tipo *ion trap* com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo negativo. O sistema foi configurado para que, somente após o tempo de exclusão, a coluna fosse acoplada ao MS. A FIGURA 4.41 ilustra o esquema representativo empregado.

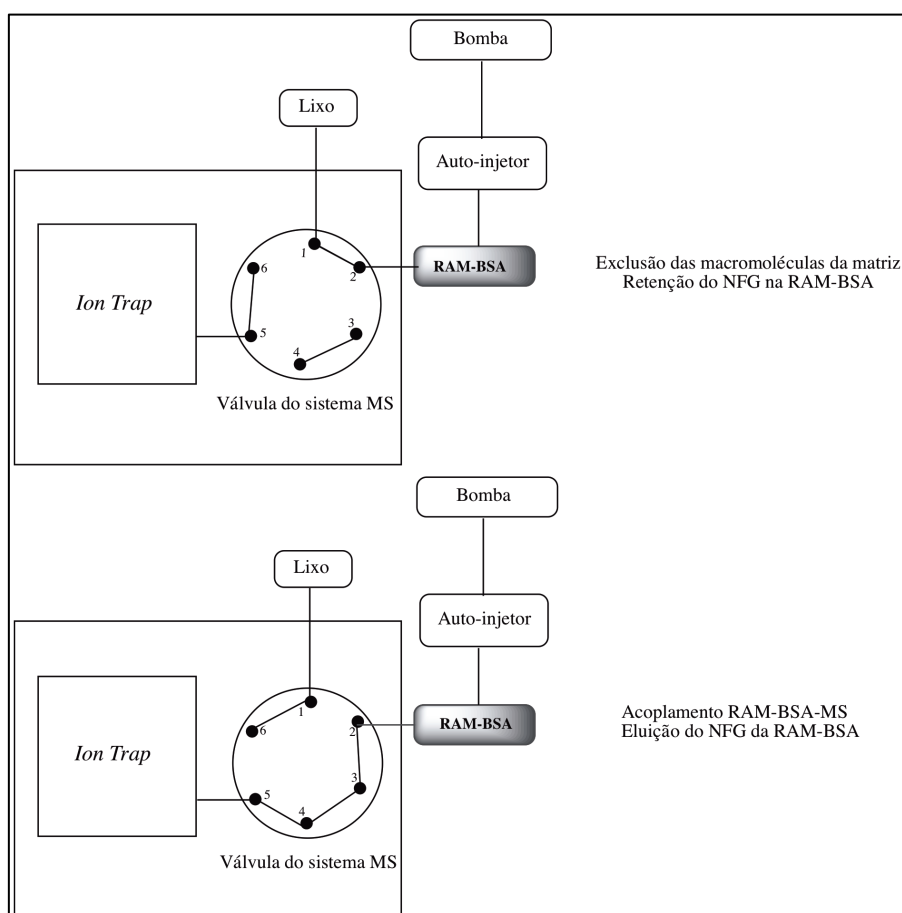


FIGURA 4. 42: Esquema representativo do sistema LC-IT em uma dimensão

As condições de ionização foram estabelecidas para o NFG por meio da inserção direta da amostra (1 µg/ml) no espectrômetro de massa. A FIGURA 4.42 mostra o espectro obtido nas condições otimizadas que estão apresentadas na TABELA 4.21.

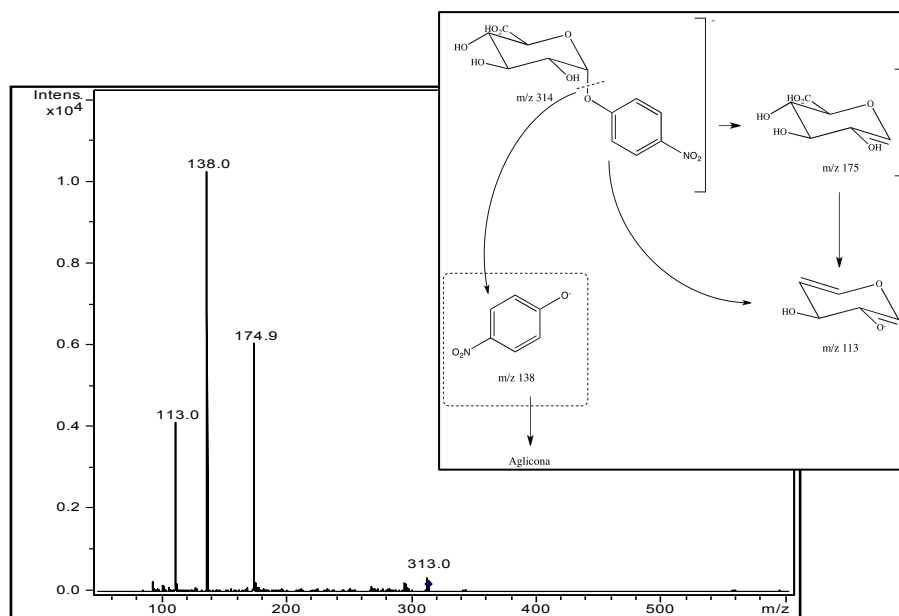


FIGURA 4. 43: Espectro de massa obtido para o NFG no *ion trap*

TABELA 4. 21: Condições de ionização obtida para o NFG no sistema *ion trap*

Voltagem do capilar (KV)	3,86
Pressão do gás (psi)	30,0
Temperatura de dessolvatação (°C)	325
Vazão do gás de dessolvatação (L/hr)	900
Amplitude de fragmentação (V)	1,00
Target ^a	50000
Max. Acc. Time (ms) ^b	100

^a Quantidade de íons acumulados no *ion trap*; ^b Tempo máximo de acúmulo de íons

O íon [M-H]⁻ m/z 314 foi isolado e fragmentado, e seu íon-produto m/z 138, referente à aglicona, monitorado. A confirmação foi realizada pela razão entre os íons m/z 175 e m/z 113, no espectro de massa do NFG.

Ajuste das condições da coluna RAM-BSA C₈

Inicialmente, a exclusão das macromoléculas da urina e a retenção do NFG na coluna RAM-BSA C₈ foram reavaliadas, ajustando-se as proporções das fases móveis. A vazão utilizada foi 0,3 mL/min, sendo que, após a saída da coluna RAM-BSA, foi instalado um divisor de vazão para que apenas 0,1 mL/min fosse enviado ao sistema MS. O procedimento de pré-tratamento da amostra por LLE com acetato de etila, anteriormente adotado (item 4.2.1 p. 111), foi mantido nesta análise. As condições estão sumarizadas na TABELA 4.22.

TABELA 4. 22: Condições cromatográficas – coluna RAM BSA C₈.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel	Evento
0,00 - 4,00	água + 0,1% AF	100	Exclusão de macromoléculas da matriz
4,01 – 9,80	formiato de amônio 10 mM pH 6,8/ACN	30:70	Eluição do glucuronídeo
9,80 – 15,0	água + 0,1% AF	100	Recondicionamento da coluna RAM

Nessas condições, analisou-se um *pool* de urina branca em comparação com o padrão de NFG em água (7,00 µg/mL). Avaliando-se os cromatogramas ilustrados na FIGURA 4.43, observa-se que não há banda no tempo de retenção do NFG e que, portanto, nessas condições, tem-se a seletividade do método.

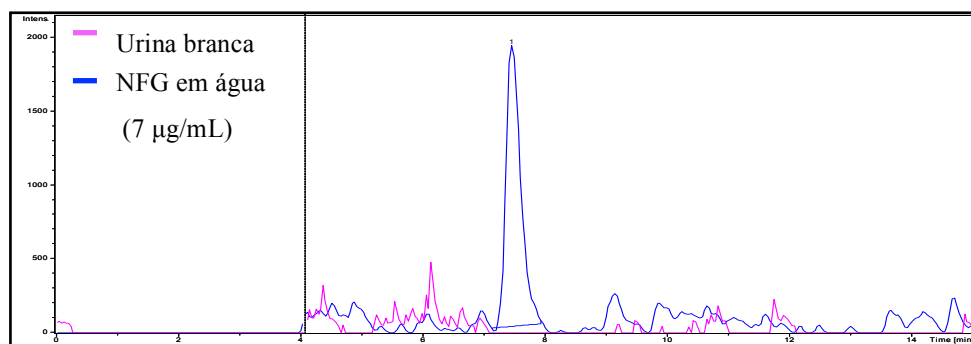


FIGURA 4. 44: Seletividade – Comparação da urina branca com água fortificada com NFG - m/z 138 extraído

Diante da seletividade obtida, o uso da segunda dimensão foi dispensado.

Validação

Esse método foi validado tendo os seguintes critérios avaliados: seletividade, efeito de matriz (EM), recuperação (RE), eficiência do processo (EP) linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão e estabilidade. Os controles de qualidade foram estabelecidos nas seguintes concentrações: 5,00 $\mu\text{g/mL}$ (controle baixo), 7,00 $\mu\text{g/mL}$ (controle médio) e 13,0 $\mu\text{g/mL}$ (controle alto).

Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se a análise individual das seis urinas que compunham o *pool* em relação ao *pool* fortificado com NFG. Os cromatogramas estão apresentados na FIGURA 4.44 e evidenciam que o método é seletivo, pois não houve coeluição de interferentes no tempo de retenção do NFG.

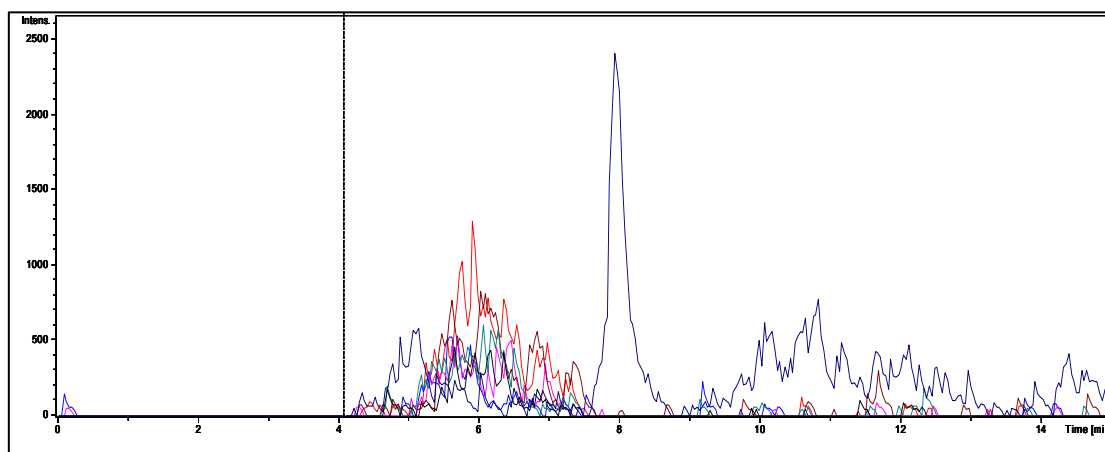


FIGURA 4. 45: Cromatogramas das urinas brancas em comparação com a urina fortificada com NFG – m/z 138 extraído

Efeito de Matriz (EM), Recuperação (RE) e Eficiência do Processo (EP)

Nesse método, o EM foi avaliado qualitativamente e quantitativamente. O qualitativo foi avaliado por meio de infusão pós-coluna do NFG em água na concentração de 7,00 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a urina *pool*, urina artificial e a água foram injetadas no LC, passando pela coluna RAM-BSA C₈, conforme esquema já apresentado na FIGURA 4.24.

Como se pode observar na FIGURA 4.45, somente para o *pool* de urina houve supressão de ionização no tempo de retenção do NFG, podendo-se inferir que o principal responsável pelo efeito de matriz seriam interferentes endógenos.

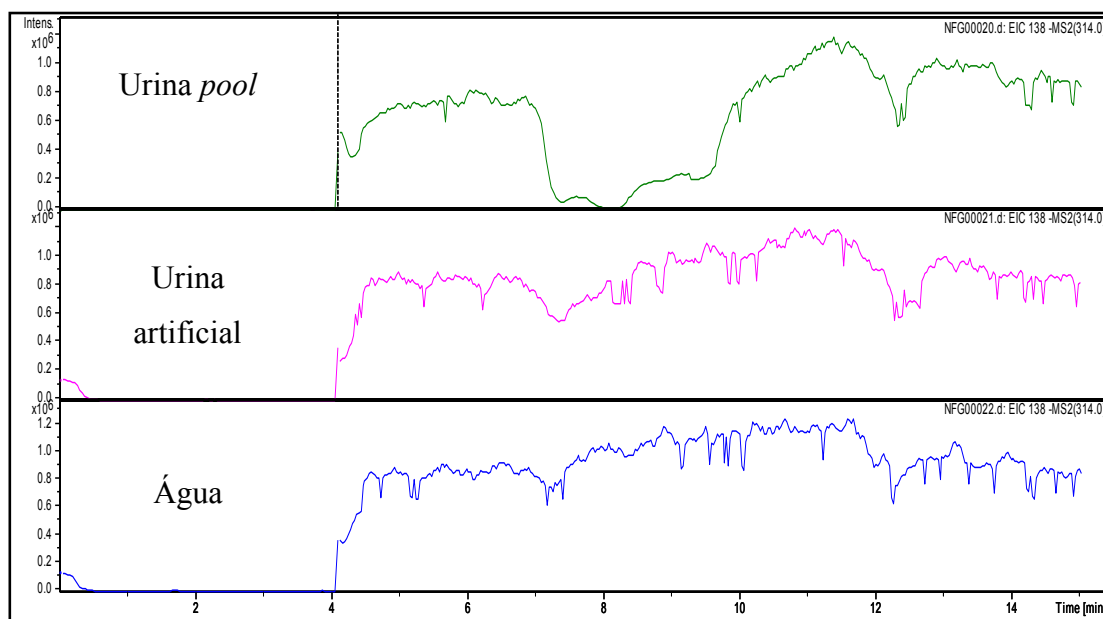


FIGURA 4. 46: Efeito de matriz qualitativo para o NFG - m/z 138 extraído

Considerando que nesse método as amostras analisadas sofreram pré-tratamento (LLE com acetato de etila), não foi possível seguir o protocolo estabelecido pela EMA para avaliação do EM por injeção direta de amostra. Portanto, o EM foi calculado levando-se em consideração a razão entre lotes de controle de qualidade fortificados, após o procedimento de LLE, e controles preparados em água. Já a recuperação foi calculada considerando a razão entre lotes de controles fortificados antes e controles fortificados após procedimento de LLE. Por último, levou-se em conta a eficiência de todo o processo, calculando a razão entre lotes de controles fortificados antes do procedimento de LLE e controles em água⁶¹.

Na TABELA 4.23, estão os resultados obtidos, sendo que o EM quantitativo foi de 7,15% para o CQB, 6,80% para o CQM e 12,4% para o CQA. Já a recuperação foi baixa, em torno de 29,0% para todos os controles, porém foi constante. Por fim, a eficiência do processo foi de 1,94% para o CQB, 2,47% para o CQM e de 4,66% para o CQA. Com isso pode-se concluir que, durante o procedimento de LLE, houve perda do analito. Devido a esta perda, a eficiência de todo o processo tornou-se

baixa. Porém como a recuperação foi constante, a precisão/exatidão do método não foi afetada.

TABELA 4. 23: Dados obtidos para EM, RE e EP

Parâmetros	CQB	CQM	CQA
EM (%)	7,15	6,80	12,4
RE (%)	28,8	29,9	29,9
EP (%)	1,94	2,47	4,66

Linearidade

Na sequência, a linearidade foi avaliada (FIGURA 4.46). Uma curva em triplicata foi construída, levando-se em consideração a área da banda cromatográfica referente às seguintes concentrações: 4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram preparadas na matriz, e o modelo matemático utilizado para representar o conjunto de dados foi regressão linear. A exatidão foi calculada em relação ao valor nominal para todas as concentrações da curva, sendo o desvio encontrado $\leq 15\%$. A precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV) entre as triplicatas foi avaliada, e o desvio foi $\leq 15\%$ para todas as concentrações. O limite de quantificação (LQ) para este método foi de 4,00 $\mu\text{g/mL}$, e o de detecção (LD) foi de 3,00 $\mu\text{g/mL}$.

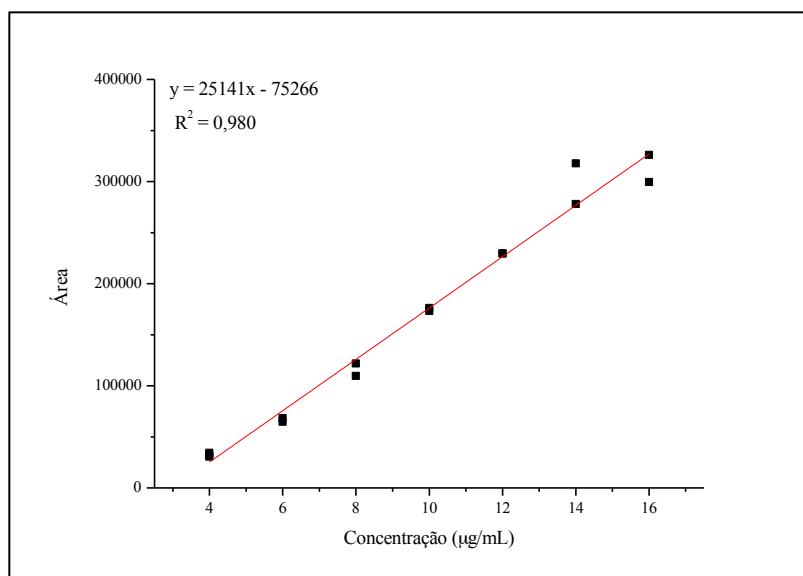


FIGURA 4. 47: Curvas de calibração para o NFG em urina

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intralote e interlotes foram avaliadas observando-se as quintuplicatas dos três lotes de controle de qualidade. Os dados estão apresentados na TABELA 4.24. Todos os lotes e também a média dos mesmos apresentaram precisão, pois o CV calculado foi menor que 15%. A exatidão foi calculada comparando-se o valor nominal do controle de qualidade preparado com o valor quantificado que foi calculado a partir da interpolação dos resultados na equação da reta obtida pela curva de calibração. Para todos os lotes e também para a média entre lotes, a exatidão ficou dentro da faixa de 85-115%, conforme especificado pelos guias internacionais de validação.^{62,128}

TABELA 4. 24: Precisão e exatidão intra e interlote (n = 5)

NFG (µg/mL)	1º Lote		2º Lote		3º Lote		Média dos 3 lotes	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
5,0	102	4,33	98,8	8,63	91,7	6,83	97,4	13,0
7,0	92,5	11,3	88,8	5,79	85,3	4,78	86,9	13,8
13	96,7	15,4	95,7	5,35	87,7	6,63	93,4	11,4

Estabilidade

A estabilidade de autoinjeter foi avaliada a partir da análise de um lote de controle de qualidade assim que preparado (t0) e após 48 (t48) e 68 horas (t68) do preparo, armazenado em temperatura ambiente. A exatidão do t0 foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação à curva média. Já a exatidão do lote t48 e t68 foi calculada a partir da interpolação das áreas em relação a uma curva recém-preparada e injetada imediatamente anterior ao respectivo lote. Os resultados estão apresentados, na TABELA 4.25, e pode-se observar que as amostras são estáveis por 48 horas em temperatura ambiente, porém após 68 horas o CQM e o CQA se apresentaram instáveis, portanto, recomenda-se que as amostras sejam preparadas e avaliadas o mais breve possível.

TABELA 4. 25: Estabilidade de autoinjeter para o NFG

Amostra	Exatidão (%)		
	t0	t48	t68
CQB	102	102	97,8
CQM	92,5	90,0	78,2
CQA	96,7	85,9	75,7

Na sequência, foi avaliado o degelo. Um lote de controle foi preparado e analisado imediatamente (Dt0). Na sequência, este foi congelado por 24 hrs (Dt24) e 60 hrs (Dt60) e, posteriormente, degelado e analisado. A exatidão para o Dt0 foi calculada a partir da interpolação da média das áreas em relação a uma curva média e para Dt24 e Dt60 em relação a uma curva injetada imediatamente anterior ao lote Dt24 (TABELA 4.26). As amostras se mostraram estáveis, durante os ciclos de degelo de 24 e 60 horas.

TABELA 4. 26: Degelo para o NFG

Amostra	Exatidão (%)		
	Dt0	Dt24	Dt60
CQB	106	97,7	113
CQM	112	110	101
CQA	94,6	106	107

Aplicação do método

Como não houve disponibilidade de urina de indivíduos expostos ao NFG para aplicar o método, mimetizaram-se amostras contaminadas para avaliar o efeito de EM na exatidão por padronização externa para amostras individuais. Assim, as urinas das três mulheres e dos três homens que compunham o *pool* foram fortificadas com NFG na concentração de 5,50 e 11,0 µg/mL. Para algumas amostras, problemas de exatidão foram observados (TABELA 4.27). Para a amostra do indivíduo H1, por exemplo, obteve-se 198% de exatidão no nível baixo e 231% no nível alto. Para a H3, os valores de exatidão (140% para o nível baixo e 143% para o alto) também estão acima do critério de aceitação. Já para a amostra M2, a exatidão obtida foi abaixo (69,9% para o nível alto). Então,

pode-se inferir que a composição individual da urina ocasionou problemas de exatidão no método.

TABELA 4. 27: Análise individual das urinas que compunham o *pool* de urinas após fortificação com NFG

Indivíduos	5,50 (µg/mL)		11,0 (µg/mL)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
M1	117	7,17	119	5,19
M2	91,4	9,38	69,9	3,67
M3	105	11,2	104	1,33
H1	198	8,91	231	0,57
H2	107	12,1	104	8,37
H3	140	6,22	143	8,79

Como relatado para o FG, a padronização externa por *pool* de urina afeta a exatidão das amostras individuais. Talvez seja importante ressaltar que as amostras individuais não foram normalizadas pela creatinina e isto pode ter contribuído para os desvios de exatidão observados.

Portanto, a calibração por adição de padrão também foi utilizada para quantificar as amostras de urina fortificadas com NFG (5,50 µg/mL). A faixa de calibração selecionada foi de 4,00 a 7,50 µg/mL. Inicialmente todas as amostras foram analisadas na concentração preparada de 5,50 µg/mL. Entretanto, algumas das amostras tiveram de ter a concentração inicial do NFG reduzida para 1,00 µg/mL, devido ao maior sinal analítico. Essas amostras foram aquelas de urinas mais límpidas.

Por extrapolação gráfica, a concentração de NFG foi determinada e este valor comparado com o valor nominal para o cálculo da exatidão. A TABELA 4.28 apresenta os valores obtidos. Todas as amostras apresentaram exatidão, de acordo com o critério de aceitação do método,

exceto para a amostra do indivíduo M2.

TABELA 4. 28: Exatidão encontrada para urinas individuais calculadas pelo método de adição de padrão

Amostras	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
H1	5,50	115
H2	1,00	111
H3	1,00	103
M1	1,00	90,9
M2	5,50	80,1
M3	5,50	92,0

A baixa capacidade de resolução dos analisadores empregados associada às transições monitoradas talvez sejam as responsáveis pela baixa exatidão encontrada para a calibração externa, para ambos os glucuronídeos estudados. De todo modo, assim como para o FG, o modo de análise aqui reportado pode ser aplicado para triagem de amostras. A quantificação das amostras contaminadas pode ser feita pelo método de calibração por adição de padrão.

CONCLUSÕES

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

5. Conclusões e Perspectivas

A coluna RAM-BSA SAX mostrou-se eficiente na exclusão das macromoléculas da urina e na retenção do FG, sendo uma excelente alternativa na análise de compostos polares e ionizáveis em relação às colunas RAM-BSA hidrofóbicas. No entanto, não foi possível acoplar a coluna RAM-BSA SAX ao sistema LC-MS/MS, pois as condições analíticas desenvolvidas demandaram alta concentração de tampão formiato de amônio, acarretando a total supressão do sinal do FG. Assim, propõe-se como perspectiva a avaliação de uma coluna RAM-BSA de troca aniônica fraca (WAX). Neste suporte não é necessário o uso de fase móvel com força iônica tão elevada, o que tornaria as colunas RAM-BSA WAX compatíveis com sistemas LC-MS/MS.

Os glucuronídeos avaliados neste trabalho apresentam baixa massa molecular. Dessa forma, foi necessária a utilização de transições não específicas, provenientes da porção ácido glucurônico da molécula para confirmação do FG e do NFG. Isso se torna um problema ainda mais relevante, quando se trata de uma matriz complexa como a urina, rica em xenobióticos e seus conjugados. Diante disso, interferentes foram detectados no mesmo tempo de retenção e nas mesmas transições, tanto para o FG quanto para o NFG, inviabilizando assim a quantificação destes glucuronídeos utilizando-se o analisador QqQ.

Os métodos desenvolvidos no sistema LC-IT por padronização externa, empregando-se como matriz *pool* de urina, apresentaram problemas de exatidão para a quantificação de amostras individuais. Isso se deve à variabilidade entre as urinas, já que as mesmas não foram normalizadas em relação à creatinina. No entanto, tais métodos se

mostraram alternativas para triagem destes analitos. Para quantificação das amostras contaminadas, utilizou-se calibração por adição de padrão. Assim, os métodos desenvolvidos podem ser considerados vantajosos em relação aos métodos clássicos, os quais utilizam a hidrólise prévia do conjugado para todas as amostras, indiscriminadamente, para, posteriormente, proceder à quantificação da aglicona livre. Esse procedimento demanda tempo, é laborioso e ainda pode gerar subprodutos durante a hidrólise, fatores que podem culminar na quantificação errônea do analito em questão. Os métodos desenvolvidos neste trabalho por injeção direta de amostra, utilizando-se o sistema LC-IT, são simples, de fácil aplicação, e conseqüentemente podem ser empregados com alto rendimento.

REFERÊNCIAS

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.*
(Marthin Luther King)

6. Referências

1. PATTERSON, A.D.; GONZALEZ, F.J. & IDLE, J.R., "Xenobiotic Metabolism: A View through the Metabolometer". *Chemical Research in Toxicology*. **23**(5): 851, 2010.
2. STEVENSON, D.E. & HUBL, U., "Optimization of beta-D-glucuronide synthesis using UDP-glucuronyl transferase". *Enzyme and Microbial Technology*. **24**(7): 388, 1999.
3. MANINI, P.; ANDREOLI, R.; MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E.; FRANCHINI, I. & NIESSEN, W.M.A., "Determination of glucuronides of molecules of toxicological interest by liquid chromatography negative-ion mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization". *Chromatographia*. **47**(11-12): 659, 1998.
4. KETOLA, R.A. & HAKALA, K.S., "Direct Analysis of Glucuronides with Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Techniques and Methods". *Current Drug Metabolism*. **11**(7): 561, 2010.
5. STRASSBURG, C.P.; MANNS, M.P. & TUKEY, R.H., "Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon - Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8". *Journal of Biological Chemistry*. **273**(15): 8719, 1998.
6. WELLS, P.G.; MACKENZIE, P.I.; CHOWDHURY, J.R.; GUILLEMETTE, C.; GREGORY, P.A.; ISHII, Y.; HANSEN, A.J.; KESSLER, F.K.; KIM, P.M.; CHOWDHURY, N.R. & RITTER, J.K., "Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease". *Drug Metabolism and Disposition*. **32**(3): 281, 2004.
7. ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J.; HOFFMASTER, K.A.; NEZASA, K.; TALLMAN, M.N. & BROUWER, K.L.R., "Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **27**(5): 447, 2006.
8. IOANNIDES, C., *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects* 1996: CRC Press LLC.
9. BEDFORD, C.T., "Glucuronic acid conjugates". *Journal of Chromatography B*. **717**(1-2): 313, 1998.

10. RITTER, J.K., "Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions". *Chemico-Biological Interactions*. **129**(1-2): 171, 2000.
11. KING, C.D.; RIOS, G.R.; GREEN, M.D. & TEPHLY, T.R., "UDP-glucuronosyltransferases". *Current Drug Metabolism*. **1**(2): 143, 2000.
12. PATANA, A.-S.; KURKELA, M.; FINEL, M. & GOLDMAN, A., "Mutation analysis in UGT1A9 suggests a relationship between substrate and catalytic residues in UDP-glucuronosyltransferases". *Protein Engineering Design & Selection*. **21**(9): 537, 2008.
13. SHIPKOVA, M. & WIELAND, E., "Glucuronidation in therapeutic drug monitoring". *Clinica Chimica Acta*. **358**(1-2): 2, 2005.
14. RADOMINSKA-PANDYA, A.; CZERNIK, P.J.; LITTLE, J.M.; BATTAGLIA, E. & MACKENZIE, P.I., "Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases". *Drug Metabolism Reviews*. **31**(4): 817, 1999.
15. WANG, X.; WANG, R.; ZHANG, Y.; LIANG, C.; YE, H.; CAO, F. & RAO, Y., "Extending the detection window of diazepam by directly analyzing its glucuronide metabolites in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1268**: 29, 2012.
16. CHAE, J.-W.; BAEK, H.-M.; KIM, S.K.; KANG, H.-I. & KWON, K.-I., "Quantitative determination of duloxetine and its metabolite in rat plasma by HPLC-MS/MS". *Biomedical Chromatography*. **27**(8): 953, 2013.
17. DOMINGUEZ-ROMERO, J.C.; GARCIA-REYES, J.F.; MARTINEZ-ROMERO, R.; MARTINEZ-LARA, E.; DEL MORAL-LEAL, M.L. & MOLINA-DIAZ, A., "Detection of main urinary metabolites of beta(2)-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **923**: 128, 2013.
18. TUDELA, E.; DEVENTER, K. & VAN EENOO, P., "Sensitive detection of 3'-hydroxy-stanozolol glucuronide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1292**: 195, 2013.
19. CABARCOS, P.; HASSAN, H.M.; JESUS TABERNERO, M. & SCOTT, K.S., "Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)". *Journal of Applied Toxicology*. **33**(7): 638, 2013.

20. KUMMER, N.; WILLE, S.; DI FAZIO, V.; LAMBERT, W. & SAMYN, N., "A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC-ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **929**: 149, 2013.
21. KOZLOWSKA, K.; POLKOWSKA, Z.; PRZYJAZNY, A. & NAMIESNIK, J., "Analytical procedures used in examining human urine samples". *Polish Journal of Environmental Studies*. **12**(5): 503, 2003.
22. RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D. & KENDALL, M., "Recent and potential developments in the analysis of urine: A review". *Analytica Chimica Acta*. **684**(1-2): 17, 2011.
23. BOOS, K.-S., *Pre-Symposium short course: Sample preparation for bioanalytical LC-MS/MS of small molecules*. 2011, 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis: João Pessoa.
24. WEINMANN, W.; VOGT, S.; GOERKE, R.; MULLER, C. & BROMBERGER, A., "Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS". *Forensic Science International*. **113**(1-3): 381, 2000.
25. SILVA, M.J.; SLAKMAN, A.R.; REIDY, J.A.; PREAU, J.L.; HERBERT, A.R.; SAMANDAR, E.; NEEDHAM, L.L. & CALAFAT, A.M., "Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **805**(1): 161, 2004.
26. KATO, K.; SILVA, M.J.; REIDY, J.A.; HURTZ, D.; MALEK, N.A.; NEEDHAM, L.L.; NAKAZAWA, H.; BARR, D.B. & CALAFAT, A.M., "Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate". *Environmental Health Perspectives*. **112**(3): 327, 2004.
27. CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; MASSOLINI, G.; LUBDA, D.; DE FAZIO, S.S.; FURLANETTO, S.; WAINER, I.W.; MANZO, L. & CACCIALANZA, G., "Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized beta-glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **35**(5): 1179, 2004.
28. CAMARGO, F.C.; LEHNER, A.F.; HARKINS, J.D.; HUGHES, C.G.; KARPIESIUK, W.; BOYLES, J.; WOODS, W.E. & TOBIN, T.,

- "Chromatographic detection of trimetoquinol (Inolin (R)) and its major urinary metabolites in the horse: A preliminary report". *Chromatographia*. **60**(7-8): 371, 2004.
29. ALBERMANN, M.E.; MUSSHOF, F. & MADEA, B., "A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **396**(7): 2441, 2010.
30. TORRADO, S.; ROIG, M.; FARRE, M.; SEGURA, J. & VENTURA, R., "Urinary metabolic profile of 19-norsteroids in humans: glucuronide and sulphate conjugates after oral administration of 19-nor-4-androstenediol". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **22**(19): 3035, 2008.
31. YAMADA, M.; ARAMAKI, S.; OKAYASU, T.; HOSOE, T.; KUROSAWA, M.; KIJIMA-SUDA, I.; SAITO, K. & NAKAZAWA, H., "Identification and quantification of metabolites common to 17 alpha-methyltestosterone and mestanolone in horse urine". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **45**(1): 125, 2007.
32. CHENG, W.-C.; YAU, T.-S.; CHENG, W.-N.; CHENG, K.-C. & SIN, D.W.-M., "Determination of 19-norandrosterone in human urine by isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry". *Accreditation and Quality Assurance*. **12**(9): 483, 2007.
33. THIERAUF, A.; KEMPF, J.; PERDEKAMP, M.G.; AUWAERTER, V.; GNANN, H.; WOHLFARTH, A. & WEINMANN, W., "Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death". *Forensic Science International*. **210**(1-3): 63, 2011.
34. ANIZAN, S.; DI NARDO, D.; BICHON, E.; MONTEAU, F.; CESBRON, N.; ANTIGNAC, J.-P. & LE BIZEC, B., "Targeted phase II metabolites profiling as new screening strategy to investigate natural steroid abuse in animal breeding". *Analytica Chimica Acta*. **700**(1-2): 105, 2011.
35. FELLI, M.; MARTELLO, S. & CHIAROTTI, M., "LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests". *Forensic Science International*. **204**(1-3): 67, 2011.
36. LIAO, C. & KANNAN, K., "Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid

- Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *Environmental Science & Technology*. **46**(9): 5003, 2012.
37. DEVENTER, K.; POZO, O.J.; DELBEKE, F.T. & VAN EENOO, P., "Direct quantification of morphine glucuronides and free morphine in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Forensic Toxicology*. **30**(2): 106, 2012.
38. KLEPACKI, J.; KLAWITTER, J.; BENDRICK-PEART, J.; SCHNIEDEWIND, B.; HEISCHMANN, S.; SHOKATI, T.; CHRISTIANS, U. & KLAWITTER, J., "A high-throughput U-HPLC-MS/MS assay for the quantification of mycophenolic acid and its major metabolites mycophenolic acid glucuronide and mycophenolic acid acyl-glucuronide in human plasma and urine". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **883**: 113, 2012.
39. TAN, Q.-Y.; ZHU, R.-H.; LI, H.-D.; WANG, F.; YAN, M. & DAI, L.-B., "Simultaneous quantitative determination of paracetamol and its glucuronide conjugate in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **893**: 162, 2012.
40. WARTH, B.; SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; FRUHMANN, P.; HAMETNER, C.; ADAM, G.; FROEHLICH, J. & KRŠKA, R., "Direct quantification of deoxynivalenol glucuronide in human urine as biomarker of exposure to the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **401**(1): 195, 2011.
41. DE BOER, T.; MEULMAN, E.; MEIJERING, H.; WIELING, J.; DOGTEROM, P. & LASS, H., "Development and validation of automated SPE-HPLC-MS/MS methods for the quantification of asenapine, a new antipsychotic agent, and its two major metabolites in human urine". *Biomedical Chromatography*. **26**(12): 1461, 2012.
42. HO, K.-L.; MURPHY, M.B.; WAN, Y.; FONG, B.M.W.; TAM, S.; GIESY, J.P.; LEUNG, K.S.Y. & LAM, M.H.W., "Synthesis and Characterization of Bromophenol Glucuronide and Sulfate Conjugates for Their Direct LC-MS/MS Quantification in Human Urine as Potential Exposure Markers for Polybrominated Diphenyl Ethers". *Analytical Chemistry*. **84**(22): 9881, 2012.
43. MILLER, E.I.; NORRIS, H.-R.K.; ROLLINS, D.E.; TIFFANY, S.T. & WILKINS, D.G., "A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled

- with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(9-10): 725, 2010.
44. NUNEZ, O.; MOYANO, E. & GALCERAN, M.T., "LC-MS/MS analysis of organic toxics in food". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **24**(7): 683, 2005.
 45. LIM, C.K. & LORD, G., "Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **25**(5): 547, 2002.
 46. 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". *Quimica Nova*. **31**(3): 623, 2008.
 47. NIESSEN, W.M.A., "Advances in instrumentation in liquid chromatography mass spectrometry and related liquid-introduction techniques". *Journal of Chromatography A*. **794**(1-2): 407, 1998.
 48. FORCISI, S.; MORITZ, F.; KANAWATI, B.; TZIOTIS, D.; LEHMANN, R. & SCHMITT-KOPPLIN, P., "Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling". *Journal of Chromatography A*. **1292**: 51, 2013.
 49. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Direct bioanalytical sample injection with 2D LC-MS". *Bioanalysis*. **4**(22): 2737, 2012.
 50. HOLCAPEK, M.; JIRASKO, R. & LISA, M., "Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques". *Journal of Chromatography A*. **1259**: 3, 2012.
 51. DEHOFFMANN, E., "Tandem mass spectrometry: A primer". *Journal of Mass Spectrometry*. **31**(2): 129, 1996.
 52. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html>, acessado em 08 de outubro de 2013.
 53. POZO, O.J.; SANCHO, J.V.; IBANEZ, M.; HERNANDEZ, F. & NIESSEN, W.M.A., "Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **25**(10): 1030, 2006.
 54. FABREGAT, A.; POZO, O.J.; MARCOS, J.; SEGURA, J. & VENTURA, R., "Use of LC-MS/MS for the Open Detection of Steroid Metabolites Conjugated with Glucuronic Acid". *Analytical Chemistry*. **85**(10): 5005, 2013.

55. NOURSE, B.D. & COOKS, R.G., "ASPECTS OF RECENT DEVELOPMENTS IN ION-TRAP MASS-SPECTROMETRY". *Analytica Chimica Acta*. **228**(1): 1, 1990.
56. NIESSEN, W.M.A. & TINKE, A.P., "LIQUID-CHROMATOGRAPHY MASS-SPECTROMETRY - GENERAL-PRINCIPLES AND INSTRUMENTATION". *Journal of Chromatography A*. **703**(1-2): 37, 1995.
57. COOKS, R.G. & KAISER, R.E., "QUADRUPOLE ION TRAP MASS-SPECTROMETRY". *Accounts of Chemical Research*. **23**(7): 213, 1990.
58. JONSCHER, K.R. & YATES, J.R., "The quadrupole ion trap mass spectrometer - A small solution to a big challenge". *Analytical Biochemistry*. **244**(1): 1, 1997.
59. VAN EECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I. & MICHOTTE, Y., "Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **877**(23): 2198, 2009.
60. SMERAGLIA, J.; BALDREY, S.F. & WATSON, D., "Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS". *Chromatographia*. **55**: S95, 2002.
61. 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.
62. *Guideline on Bioanalytical Method Validation* 2011.
63. NOVAKOVA, L., "Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis". *Journal of Chromatography A*. **1292**: 25, 2013.
64. KATAOKA, H. & SAITO, K., "Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(5): 926, 2011.
65. MARTIN-ESTEBAN, A., "Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **45**: 169, 2013.
66. KOLE, P.L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J. & SHESHALA, R., "Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods". *Biomedical Chromatography*. **25**(1-2): 199, 2011.
67. NOVAKOVA, L. & VLCKOVA, H., "A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation". *Analytica Chimica Acta*. **656**(1-2): 8, 2009.

68. NAMERA, A. & SAITO, T., "Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis". *Bioanalysis*. **5**(8): 915, 2013.
69. XU, R.N.; FAN, L.; RIESER, M.J. & EL-SHOUBAGY, T.A., "Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **44**(2): 342, 2007.
70. 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.
71. HUANG, Z. & LEE, H.K., "Materials-based approaches to minimizing solvent usage in analytical sample preparation". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **39**: 228, 2012.
72. TOBISZEWSKI, M. & NAMIESNIK, J., "Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **35**: 67, 2012.
73. PENA-PEREIRA, F.; DUARTE, R.M.B.O. & DUARTE, A.C., "Considerations on the application of miniaturized sample preparation approaches for the analysis of organic compounds in environmental matrices". *Central European Journal of Chemistry*. **10**(3): 433, 2012.
74. HU, Y.; PAN, J.; ZHANG, K.; LIAN, H. & LI, G., "Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **43**: 37, 2013.
75. NUNEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C.P.B.; LUCCI, P. & BUSQUETS, R., "State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **927**: 3, 2013.
76. COUCHMAN, L., "Turbulent flow chromatography in bioanalysis: a review". *Biomedical Chromatography*. **26**(8): 892, 2012.
77. KATAOKA, H., "Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application - a review". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **373**(1-2): 31, 2002.
78. KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y. & SAITO, K., "Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review". *Analytica Chimica Acta*. **655**(1-2): 8, 2009.
79. KATAOKA, H. & SAITO, K., "Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis". *Bioanalysis*. **4**(7): 809, 2012.
80. HAGESTAM, I.H. & PINKERTON, T.C., "INTERNAL SURFACE REVERSED-PHASE SILICA SUPPORTS FOR LIQUID-CHROMATOGRAPHY". *Analytical Chemistry*. **57**(8): 1757, 1985.

81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. HAGINAKA, J.; WAKAI, J. & YASUDA, H., "SYNTHESIS OF MIXED-FUNCTIONAL-PHASE SILICA SUPPORTS FOR LIQUID-CHROMATOGRAPHY AND THEIR APPLICATIONS TO ASSAYS OF DRUGS IN SERUM". *Journal of Chromatography*. **535**(1-2): 163, 1990.
86. 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.
87. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on an ISRP column, with column switching". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **19**(19): 3221, 1996.
88. 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.
89. MENEZES, M.L.; FELIX, G. & DEMARCHI, A., "On-line extraction and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on an ISRP column". *Chromatographia*. **47**(1-2): 81, 1998.

90. FELIX, G. & CAMPESE, D., "Development of a new RAM-chiral column for determination of chiral drugs in biological fluids by HPLC". *Chromatographia*. **66**(3-4): 159, 2007.
91. CASS, Q.B.; GOMES, R.F.; CALAFATTI, S.A. & PEDRAZZOLI, J., "Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 235, 2003.
92. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI, J., JR. & 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.
93. OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(4): 1180, 2006.
94. PEREIRA, A.V. & CASS, Q.B., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **826**(1-2): 139, 2005.
95. MOURA, F.; DE ALMEIDA, F.G.; LOPES, B.R. & CASS, Q.B., "Quantification of ampicillin in bovine milk by coupled-column ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Separation Science*. **35**(19): 2615, 2012.
96. OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup". *Talanta*. **71**(3): 1233, 2007.
97. LOPES, B.R.; BARREIRO, J.C.; BARALDI, P.T. & CASS, Q.B., "Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **889**: 17, 2012.
98. 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.

99. 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.
100. 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.
101. SCHWERZ, L. *Desenvolvimento de métodos para a análise de glicuronídeos por cromatografia líquida de alta eficiência com injeção direta*. São carlos, Departamento de Química, 2002. Dissertação de mestrado, p 100.
102. 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.
103. 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*. **881-82**: 27, 2012.
104. RODRIGUEZ-GONZALO, E.; GARCIA-GOMEZ, D. & CARABIAS-MARTINEZ, R., "Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis". *Journal of Chromatography A*. **1218**(50): 9055, 2011.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. SCHETTGEN, T.; MUSIOL, A.; ALT, A.; OCHSMANN, E. & KRAUS, T., "A method for the quantification of biomarkers of exposure to acrylonitrile and 1,3-butadiene in human urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **393**(3): 969, 2009.
110. SCHETTGEN, T.; MUSIOL, A.; ALT, A. & KRAUS, T., "Fast determination of urinary S-phenylmercapturic acid (S-PMA) and S-benzylmercapturic acid (S-BMA) by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **863**(2): 283, 2008.
111. 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.
112. SANTOS-NETO, A.J.; BERGQUIST, J.; LANCAS, F.M. & SJOEBERG, 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.
113. RBEIDA, O.; CHRISTIAENS, B.; HUBERT, P.; LUBDA, D.; BOOS, K.S.; CROMMEN, J. & CHIAP, P., "Evaluation of a novel anion-exchange restricted-access sorbent for on-line sample clean-up prior to the determination of acidic compounds in plasma by liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1030**(1-2): 95, 2004.
114. KESKI-HYNNILA, H.; RAANAA, K.; FORSBERG, M.; MANNISTO, P.; TASKINEN, J. & KOSTIAINEN, R., "Quantitation of entacapone glucuronide in rat plasma by on-line coupled restricted access media column and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **759**(2): 227, 2001.
115. U.S. Environmental Protection Agency; *Toxicological Review of Phenol*, 2002.

116. U.S. Environmental Protection Agency; *Toxicological Review of Nitrobenzene*, 2009.
117. CARL A BURTIS, E.R.A., DAVID E. BRUNS, *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 2001: Elsevier Science.
118. KUKLENYIK, Z.; CALAFAT, A.M.; BARR, J.R. & PIRKLE, J.L., "Design of online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) hyphenated systems for quantitative analysis of small organic compounds in biological matrices". *Journal of Separation Science*. **34**(24): 3606, 2011.
119. 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.
120. 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.
121. WARTH, B.; SULYOK, M.; FRUHMANN, P.; MIKULA, H.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; HAMETNER, C.; ABIA, W.A.; ADAM, G.; FROEHLICH, J. & KRKA, R., "Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **26**(13): 1533, 2012.
122. DOWLING, G.; REGAN, L.; TIERNEY, J. & NANGLE, M., "A hybrid liquid chromatography-mass spectrometry strategy in a forensic laboratory for opioid, cocaine and amphetamine classes in human urine using a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer". *Journal of Chromatography A*. **1217**(44): 6857, 2010.
123. THIERAUF, A.; GNANN, H.; WOHLFARTH, A.; AUWAERTER, V.; PERDEKAMP, M.G.; BUTTLER, K.-J.; WURST, F.M. & WEINMANN, W., "Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulphate after the consumption of "non-alcoholic" beer". *Forensic Science International*. **202**(1-3): 82, 2010.
124. GU, J.K.; ZHONG, D.F. & CHEN, X.Y., "Analysis of O-glucuronide conjugates in urine by electrospray ion trap mass spectrometry". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **365**(6): 553, 1999.
125. 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.
126. MALDANER, L.; COLLINES, C.H. & JARDIM, I.C.S.F., "MODERN STATIONARY PHASES FOR REVERSED PHASE

- HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY". *Quimica Nova*. **33**(7): 1559, 2010.
127. CUNLIFFE, J.M., "Fast chromatography in the regulated bioanalytical environment: sub-2- μ m versus fused-core particles". *Bioanalysis*. **4**(8): 861, 2012.
128. Food and Drug Administration *Bioanalytical Method Validation* 2001.
129. PEIXE, T.S.; NASCIMENTO, E.D.S. & DELLA ROSA, H.V., "Determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa em trabalhadores que utilizam resinas fenólicas em fundições". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **42**: 279, 2006.
130. KHYMENETS, O.; FARRE, M.; PUJADAS, M.; ORTIZ, E.; JOGLAR, J.; COVAS, M.I. & DE LA TORRE, R., "Direct analysis of glucuronidated metabolites of main olive oil phenols in human urine after dietary consumption of virgin olive oil". *Food Chemistry*. **126**(1): 306, 2011.
131. HOLCAPEK, M.; KOLAROVA, L. & NOBILIS, M., "High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **391**(1): 59, 2008.
132. DENOROY, L.; ZIMMER, L.; RENAUD, B. & PARROT, S., "Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **927**: 37, 2013.
133. june 24
134. CHIRITA, R.-I.; WEST, C.; ZUBRZYCKI, S.; FINARU, A.-L. & ELFAKIR, C., "Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1218**(35): 5939, 2011.
135. SeQuant ZIC-HILIC HPLC Columns - For all who expect more 24 de junho

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
 Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
 Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
 Fax: (016) 3361.3176
 CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

progg@power.ufscar.br - <http://www.progg.ufscar.br/>

CAAE 3010.0.000.135-09

Título do Projeto: Desenvolvimento de Métodos para Análise de Glucuronídeos em Urina Humana por Comatografia Líquida de alta Eficiência com Injeção Direta de Amostras

Classificação: Grupo III

Procedência: Departamento de Química

Pesquisadores (as): Thaís Corrêa Castral, Quêzia Bezerra Cass (orientadora)

Processo nº.: 23112.002925/2009-46

Parecer Nº. 314/2009

1. Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ___/___/___ e ao término do estudo.

2. Avaliação do projeto


O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (CEP/UFSCar) analisou o projeto de pesquisa acima identificado e considerando os pareceres do relator e do revisor DELIBEROU:

A proposta de estudo apresentada atende às exigências éticas e científicas fundamentais previstas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

3. Conclusão:

Projeto aprovado

São Carlos, 2 de setembro de 2009.


 Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa
 Coordenadora do CEP/UFSCar