

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

**“AVALIAÇÃO SISTEMÁTICA DO EFEITO DE MATRIZ EM
ENSAIOS BIOANALÍTICOS POR LC-MS/MS PARA A
ANÁLISE DE RIFAMPICINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS”**

Taciane Mitsuko Iceri *

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Profa. Dra. Regina V. Oliveira

*** Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2011**

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

l15as

Iceri, Taciane Mitsuko.

Avaliação sistemática do efeito de matriz em ensaios bioanalíticos por LC-MS/MS para a análise de rifampicina em fluidos biológicos / Taciane Mitsuko Iceri. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
117 f.

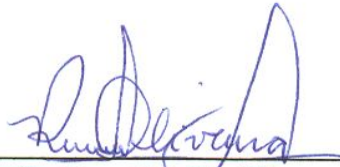
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. Cromatografia líquida. 3. Preparação de amostra (Química analítica). 4. Fontes de ionização. 5. Eficiência cromatográfica. I. Título.


CDD: 543 (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 Mestrado Acadêmico

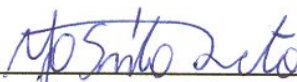
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Taciane Mitsuko Iceri, realizada em 29 de abril de 2011:



Prof. Dra. Regina Vincenzi Oliveira



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Alvaro José dos Santos Neto

Dedico...

Aos meus pais Massamitsu e Nilza,
que não só me ensinaram valores de seriedade,
dedicação, respeito, responsabilidade, dentre outros,
como também trabalharam muito,
não somente para adoçar a vida de muitas pessoas,
mas principalmente,
para construir um futuro melhor para seus filhos.

Sei das noites mal dormidas,
sei dos dias inteiros de trabalho,
sei dos seus sonhos, abdicados ou realizados.

E hoje não seria justo,
se não dedicar esta dissertação,
àqueles que, com muito esforço,
me ajudaram a tornar tudo isso possível.

Pai e Mãe, vocês me escolheram filho, eu os fiz exemplos!

Dedico também aos meus queridos irmãos
e amigos Daiane e Felipe,
que deram suporte aos meus pais na minha ausência,
e que sempre me preenchiem de alegrias, e risadas,
na minha presença.

O sonho

Sonhe com aquilo que você quer ser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

Clarice Lispector

Agradecimentos

Meu sincero agradecimento à Profa. Dra. Regina V. Oliveira, que me recebeu, e me deu a oportunidade de conhecer a Química sob uma nova perspectiva. Obrigada pela sua paciência, compreensão, dedicação, ensinamentos, e confiança. Levarei sempre comigo os conhecimentos e crescimento profissional adquiridos durante meu mestrado.

Agradeço à Profa. Dra. Quezia B. Cass, pelas contribuições dadas ao projeto, pelo empréstimo de equipamentos, e concessão de materiais e reagentes.

A todos os meus amigos de laboratório, que me ajudaram inúmeras vezes no desenvolvimento deste projeto. Obrigada Grupo de Síntese Orgânica e CLAE: Marina Denadai, Juliana, Marina Beghini, Kenia, Pedro, Roberta, Franciane, Marcela, Manuela, Tiago, Fernando, Bianca, Thais, Neila, Paulo, Ricardo, Vinícius e Bruna. Agradeço também ao Alexandre, que é como se fosse do nosso laboratório, pela sua disposição e assistência com os equipamentos.

À empresa Sigma-Aldrich que nos concedeu as colunas Ascentis Express[®] Fused Core Supelco para a execução deste projeto científico.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos, da UNESP, Campus Araraquara, Instituto de Química, pelo empréstimo da ultracentrífuga, e ao Tarcísio pelo suporte técnico na utilização deste equipamento.

Aos meus pais, Massamitsu e Nilza, irmãos Daiane e Felipe, pela paciência, incentivo e amor incondicional. Ao meu avô, Yassuo, de quem herdei o lado científico, e minha tia Xi, pelo apoio à minha família.

Ao Fabio, que foi compreensivo e companheiro nos momentos difíceis, e também meu consultor para assuntos químicos. Obrigado por suas críticas sempre construtivas, elas foram e serão muito importantes para mim.

Aos meus amigos Thiago, José Vinícius, e Gustavo que são parceiros desde a graduação. A amizade de vocês me alegrou durante todos estes anos.

Ao senhor Ari, que me ajudou diversas vezes e foi muito paciente comigo. A dona Cidinha por sua simpatia e conversas agradáveis.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Química, da UFSCar, Campus São Carlos, e seus professores.

Durante estes dois anos de mestrado aprendi muitas coisas, as quais não abrangeram somente o campo da pesquisa científica, mas também da minha formação como profissional. A todos que me ajudaram na condução deste projeto e no meu crescimento pessoal, o meu muito obrigada!

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
API	Ionização à Pressão Atmosférica
BSA	Albumina Sérica Bovina
C ₁₈	Octadecil-Sílica
C ₈	Octil-Sílica
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CNLS	Varredura de Perda Neutra Constante
CV	Coefficiente de Variação
D.I.	Diâmetro Interno
ESI	Ionização por Electrospray
FA	Ácido Fórmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HLB	Balanço Hidrofílico-Lípofílico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ISO	Isopropanol
IT	Analizador do Tipo <i>Ion Trap</i>
k	Fator de Retenção Cromatográfico
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Seqüencial
<i>m/z</i>	Razão Massa/Carga
ME	Efeito de Matriz
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de Massas Seqüencial
PE	Eficiência de Processo
PMSF	Fluoreto de Fenil-metil-sulfonil
PP(ACN)	Precipitação de Proteínas com ACN como Agente Precipitante
PP(MeOH)	Precipitação de Proteínas com MeOH como Agente Precipitante
Q	Analizador do Tipo Quadrupolo
RAM	Fases de Acesso Restrito
RAM-BSA	Fase RAM BSA-Imobilizada
RAM-C ₁₈ -BSA	Fase RAM tipo Octadecil-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-C ₈ -BSA	Fase RAM tipo Octil-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-CN-BSA	Fase RAM tipo Ciano-Sílica BSA-Imobilizada

RAM-Ph-BSA	Fase RAM tipo Fenil-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-SCX-BSA	Fase RAM tipo Troca Catiônica Forte-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-WAX-BSA	Fase RAM tipo Troca Aniônica Fraca-Sílica BSA-Imobilizada
RE	Recuperação
RHZ	Sistema Composto pelos Fármacos Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida
RIF	Rifampicina
SIM	Monitoramento de Íons Seleccionados
SPE	Extração em Fase Sólida
SRM	Monitoramento de Reações Seleccionadas
TOF	Analisador do Tipo <i>Time-of-Flight</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV-Vis	Ultra-violeta Visível

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS:

INTRODUÇÃO:

TABELA	1.1-	Experimentos de MS/MS ^a	7
---------------	-------------	--	---

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

TABELA	3.1-	Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Ascentis Express [®] Fused Core Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm) e fonte de ionização por ESI.....	35
---------------	-------------	--	----

TABELA	3.2-	Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Ascentis Express [®] Fused Core Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm) e fonte de ionização por APCI	36
---------------	-------------	--	----

TABELA	3.3-	Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 µm) e fonte de ionização por ESI	37
---------------	-------------	--	----

TABELA	3.4-	Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 µm) e fonte de ionização por APCI	38
---------------	-------------	---	----

TABELA	3.5-	Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em frações microssomais com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) ...	46
---------------	-------------	---	----

TABELA	3.6-	Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em plasma humano com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å)	47
---------------	-------------	--	----

TABELA	3.7-	Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em frações microssomais com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) acoplada à coluna C18 Ascentis Express	48
---------------	-------------	--	----

TABELA	3.8-	Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em plasma humano com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) acoplada à coluna C18 Ascentis Express	48
---------------	-------------	---	----

TABELA	3.9-	Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS com emprego <i>on-line</i> da coluna RAM-C8-BSA no modo simples ou multidimensional de análise acoplada à coluna C18 Ascentis Express. Fonte de ionização por ESI	49
---------------	-------------	--	----

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

TABELA 4.1- Valores da Média de ABS ^a , Coeficiente de Variação (CV) e Exatidão para as amostras preparadas em diferentes concentrações de BSA ^b para a determinação da concentração protéica da fração microssomal obtida.....	54
TABELA 4.2- Valores obtidos de ME ^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais: coluna comercial C18 Ascentis Express vs. coluna C18 Nucleosil <i>homemade</i> . Preparos de amostra <i>off-line</i> e ionização por ESI (+).....	62
TABELA 4.3- Valores obtidos de RE ^a e PE ^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais. Coluna comercial C18 Ascentis Express vs. coluna C18 Nucleosil <i>homemade</i> . Preparos de amostra <i>off-line</i> e ionização por ESI (+).....	64
TABELA 4.4- Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por PP ^a e ionização por ESI (+)...	67
TABELA 4.5- Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e na matriz biológica. Pré-tratamento por SPE ^a e ionização por ESI (+)...	68
TABELA 4.6- Valores obtidos de ME ^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais com emprego de ESI e APCI. Preparos de amostra <i>off-line</i> e coluna C18 Ascentis Express	70
TABELA 4.7- Valores obtidos de RE ^a e PE ^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais com emprego de ESI e APCI. Preparo de amostra <i>off-line</i> e coluna C18 Ascentis Express	71
TABELA 4.8- Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por PP ^a , coluna C18 Ascentis Express e ionização por ESI e APCI	74
TABELA 4.9- Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por SPE ^a , coluna C18 Ascentis Express e ionização por ESI e APCI	75
TABELA 4.10- Valores obtidos de ME ^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando submetidos à extração por SPE. Coluna C18 Nucleosil e ionização por ESI e APCI	77
TABELA 4.11- Valores obtidos de RE ^a e PE ^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando submetidos à extração por SPE. Coluna C18 Nucleosil <i>homemade</i> e ionização por ESI e APCI.....	78
TABELA 4.12- Precisão intradia (CV %) para a análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e na matriz. Pré-tratamento por SPE ^a , coluna C18 Nucleosil e ionização por ESI e APCI.....	79

TABELA 4.13- Precisão (CV %) das análises durante a avaliação da exclusão das proteínas provenientes de plasma humano e de frações microssomais pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) nos dois primeiros minutos de corrida cromatográfica..... 94

TABELA 4.14- Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (m/z 823 → 791) em água e na matriz biológica. Pré-tratamentos *on-line* 104

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS:

INTRODUÇÃO:

FIGURA	1.1-	Diagrama de blocos para um sistema de HPLC.....	3
FIGURA	1.2-	Diagrama de blocos para um sistema de MS.....	4
FIGURA	1.3-	Relação entre a massa molecular e polaridade do analito com o tipo de mecanismo de ionização (MAURER, 1998)	5
FIGURA	1.4-	Experimentos de infusão pós-coluna, uma avaliação qualitativa do efeito de matriz	10
FIGURA	1.5-	Experimentos de infusão pós-coluna para a determinação do efeito de matriz, sendo: (-----) o cromatograma obtido para a injeção de fase móvel, e (-----) o cromatograma obtido para o extrato resultante do preparo de amostra. A) ME de aumento de ionização; e B) ME de supressão de ionização do analito na presença dos interferentes da matriz.....	11
FIGURA	1.6-	Determinação do efeito de matriz por experimentos quantitativos. Cromatogramas (-----) para o analito em solvente; e (-----) para a matriz fortificada com o analito após o procedimento de extração.....	13
FIGURA	1.7-	Parâmetros associados ao efeito de matriz	14
FIGURA	1.8-	Representações esquemáticas das etapas dos preparos de amostra: A) PP e B) SPE.....	18
FIGURA	1.9-	Representação esquemática das fases RAM-BSA e seu mecanismo de exclusão, sendo (A) o analito, e (FI) a fase de interação presente no interior do poro	20
FIGURA	1.10-	Estrutura molecular da rifampicina.....	22

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

FIGURA	3.1-	Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz.....	30
FIGURA	3.2-	Esquema do procedimento experimental empregado para a determinação da eficiência de exclusão protéica para colunas RAM-BSA (LIMA <i>et al.</i> , 2006)	45

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

- FIGURA 4.1-** Etapas da extração das frações microssomais. A) O homogenato pronto para a primeira centrifugação; e B) a mistura resultante da ultracentrifugação. 53
- FIGURA 4.2-** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA..... 54
- FIGURA 4.3-** Esquema representativo das fases estacionárias: convencionais e com a tecnologia *Fused Core*..... 56
- FIGURA 4.4-** Espectro de SRM da rifampicina (m/z 823 → 791)..... 56
- FIGURA 4.5-** Proposta de fragmentação da rifampicina..... 57
- FIGURA 4.6-** Cromatograma relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Ascentis Express. Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de vazão para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 µL; Ionização por ESI (+); e Amplitude de fragmentação de 0,20 57
- FIGURA 4.7-** Cromatograma relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Nucleosil. Fase móvel: MeOH/H₂O (80:20, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de vazão para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 µL; Ionização por ESI (+); e Amplitude de fragmentação de 0,22... 58
- FIGURA 4.8-** Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz com preparo de amostras *off-line*..... 61
- FIGURA 4.9-** Cromatograma relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Ascentis Express. Fase móvel: (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção: 10 µL; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; e Amplitude de fragmentação: 0,19 69
- FIGURA 4.10-** Cromatogramas relativos à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Nucleosil. Fase móvel: MeOH/H₂O (80:20, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 µL de (-----) rifampicina em fase móvel; e rifampicina adicionada pós extração de (-----) plasma humano e (-----) frações microssomais. Em A) Ionização por ESI (+) e Amplitude de fragmentação de 0,22. Em B) Ionização por APCI (+); Corona: + 4000 nA e Amplitude de fragmentação de 0,24 77

FIGURA	4.11-	Esquema do experimento de infusão pós-coluna.....	81
FIGURA	4.12-	Fluxograma dos experimentos de infusão pós-coluna feitos para a investigação do efeito de matriz qualitativo.....	81
FIGURA	4.13-	Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm); Fase móvel: MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão HPLC: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μL; Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μL/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H ₂ O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H ₂ O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de microsoma tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.....	83
FIGURA	4.14-	Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm); Fase móvel: MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão HPLC: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μL; Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μL/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H ₂ O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H ₂ O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de plasma humano tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.....	84
FIGURA	4.15-	Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm); Fase móvel: MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μL; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μL/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H ₂ O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H ₂ O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de microsoma tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.....	86
FIGURA	4.16-	Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 → 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm); Fase móvel: MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μL; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μL/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H ₂ O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H ₂ O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de plasma humano tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.....	87
FIGURA	4.17-	Esquema do procedimento de preparo das colunas RAM-BSA.....	89
FIGURA	4.18-	Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff, e subsequente intercruzamento de ligações (LIMA, 2004).....	90
FIGURA	4.19-	Reações de (a) redução dos aldeídos residuais e (b) das iminas (LIMA, 2004).....	90
FIGURA	4.20-	Fases estacionárias utilizadas nas colunas RAM-BSA.....	91

FIGURA 4.21- Eficiência de exclusão protéica de frações microssomais e plasma humano pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.), nos dois primeiros minutos de eluição. Volumes de injeção: 200 μL , 100 μL , e 50 μL	93
FIGURA 4.22- Espectro de absorvância para a avaliação da exclusão protéica de plasma humano pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.). Volume de injeção: 50 μL	93
FIGURA 4.23- Cromatograma referente à análise de rifampicina em frações microssomais. Sistema LC-UV: coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA); volume de injeção: 50 μL ; vazão: 1,0 mL/min e $\lambda = 254 \text{ nm}$. Etapa 1: Exclusão das proteínas microssomais e retenção seletiva da rifampicina; Etapa 2: Eluição da rifampicina; Etapa 3: Limpeza da coluna RAM; Etapa 4: Re-condicionamento da coluna extratora com a fase móvel otimizada para a etapa 1	95
FIGURA 4.24- Perfis cromatográficos referentes à exclusão protéica pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) quando diferentes volumes de plasma humano são injetados: 10 μL , 50 μL e 100 μL . Fase móvel: 100 % de H_2O ; vazão: 0,2 mL/min e $\lambda: 290 \text{ nm}$	96
FIGURA 4.25- Cromatogramas da análise de rifampicina (50 $\mu\text{g/mL}$) nas colunas RAM-C8-BSA e RAM-C18-BSA (ambas 3,0 x 0,21 cm D.I.). Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 50 μL ; Vazão 0,2 mL/min e $\lambda = 254 \text{ nm}$	97
FIGURA 4.26- Cromatogramas de exclusão das proteínas das (-----) frações microssomais e (-----) plasma humano pela coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA). Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 50 μL ; Fase móvel: H_2O para o plasma humano, e H_2O com 0,05 % FA, para a fração microssomal (10 mg/mL); Vazão 1,0 mL/min e $\lambda = 290 \text{ nm}$	98
FIGURA 4.27- Esquema do sistema de cromatografia multidimensional.....	100
FIGURA 4.28- Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz com emprego de preparo de amostra <i>on-line</i> das matrizes biológicas	101

FIGURA 4.29- Cromatogramas relativos à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina empregando-se os métodos: A) unidimensional (coluna RAM); e B) multidimensional (colunas RAM + Ascentis Express).

Condições HPLC:

1° dimensão (aplicado aos métodos uni e multidimensional) – Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μ m, 100 Å); Volume de injeção: 50 μ L; Fase móvel de exclusão: H₂O com 0,05 % FA; Fase móvel de análise: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 1,0 mL/min. Injeção de: (-----) rifampicina 500 ng/mL em H₂O, e (-----) microssoma fortificado com rifampicina (500 ng/mL na matriz).

2° dimensão (aplicado ao método multidimensional) – Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min.

Condições MS/MS: Vazão de entrada no MS: 100 μ L/min (ajustada com divisor de fluxo); Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19 103

FIGURA 4.30- Valores obtidos de ME para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando comparados o emprego *on-line* da coluna RAM-C8-BSA nas configurações unidimensional e multidimensional. 104

RESUMO

RESUMO

“AVALIAÇÃO SISTEMÁTICA DO EFEITO DE MATRIZ EM ENSAIOS BIOANALÍTICOS POR LC-MS/MS PARA A ANÁLISE DE RIFAMPICINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS”

Ensaio bioanalítico por LC-MS/MS foram conduzidos a fim de investigar o efeito de matriz (ME) na análise de rifampicina (RIF) em matrizes biológicas, plasma humano ou frações microssomais, submetidas a diferentes procedimentos de pré-tratamento de amostras: 1) *off-line* – extração em fase sólida (SPE), precipitação de proteínas com acetonitrila (PP(ACN)) ou metanol (PP(MeOH)) e 2) *on-line* – emprego da coluna de meio de acesso restrito (RAM) de albumina sérica bovina (BSA) de suporte C8 no modo simples ou multidimensional de análise. O ME também foi determinado quando diferentes eficiências cromatográficas e mecanismos de ionização foram utilizados. Foram selecionadas fases estacionárias convencionais (C18 Nucleosil *homemade*; 5 µm, 100 Å) e colunas com tecnologia *Fused Core* (C18 Supelco Ascentis® Express; 2,7 µm, 90 Å) e fontes de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e *electrospray* (ESI) foram empregadas. Dentre os procedimentos *off-line* de tratamento de amostras (RIF 50 µg/mL) utilizados nos experimentos quantitativos de determinação do ME por LC-ESI-MS/MS constatou-se que a SPE foi o procedimento mais eficiente na redução do ME e a coluna Ascentis Express foi a condição cromatográfica que promoveu uma melhor redução do ME. Dessa forma, para a avaliação de distintos mecanismos de ionização foi selecionada a coluna Ascentis Express e, por meio de experimentos quantitativos e qualitativos de determinação do ME, notou-se que a ionização por ESI foi menos susceptível ao ME que a APCI, em ambos os experimentos, sendo a extração procedida na configuração *off-line*. Os experimentos de fortificação das amostras biológicas antes e depois do procedimento de extração *off-line* forneceram também valores de recuperação (RE) e eficiência de processo (PE). Para o preparo de amostra com emprego *on-line* da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) foram desenvolvidos dois métodos: 1) no modo simples e 2) na configuração multidimensional de análise, com a fase estacionária C18 Ascentis Express na segunda dimensão. Neste procedimento foi utilizada a ionização por ESI. O ME foi quantificado (RIF 500 ng/mL) e, para as frações microssomais, a adição da

segunda dimensão de análise (multidimensional) proporcionou uma redução do ME de 47,86 % para 14,63 %. Para o plasma humano não foi possível indicar um perfil de ME, uma vez que esta comparação foi comprometida pelos dados correspondentes ao método unidimensional (CV = 38,73 %). Confrontando os resultados obtidos para as frações microssomais e plasma humano, para todos os procedimentos de extração *off-line* e *on-line*, verificou-se, de maneira geral, que não houve uma relação de ME predominante entre as duas matrizes. Neste projeto, a análise da rifampicina por LC-MS/MS foi procedida no modo positivo, monitorando a transição m/z 823 \rightarrow 791.

ABSTRACT

ABSTRACT

“SYSTEMATIC EVALUATION OF THE MATRIX EFFECT IN BIOANALYTICAL ASSAYS FOR RIFAMPICIN ANALYSIS IN BIOLOGICAL FLUIDS BY LC-MS/MS”

Bioanalytical assays by LC-MS/MS were conducted in order to investigate the matrix effect (ME) in the analysis of rifampicin (RIF) in biological matrices, human plasma or microsomal fractions, which were submitted to different sample pretreatment procedures: 1) off-line – solid phase extraction (SPE), protein precipitation using acetonitrile (PP(ACN)) or methanol (PP(MeOH)) and 2) on-line – by using of a restricted access media (RAM) bovine serum albumin (BSA) octyl column in a single or multidimensional mode of analysis. The ME was also determined through the employment of different chromatographic conditions and different mechanisms of ionization. Conventional stationary phases (C18 Nucleosil homemade; 5 μm , 100 \AA) and columns with Fused Core technology (C18 Supelco Ascentis[®] Express; 2,7 μm , 90 \AA), as well as, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray (ESI) were investigated in this work. Among the off-line sample clean-up (RIF 50 $\mu\text{g/mL}$) procedures evaluated in the quantitative ME experiments by LC-ESI-MS/MS, it was found that SPE showed to be more efficient in the reduction of ME. Additionally, the chromatographic conditions using the Ascentis Express column provided the best result for ME reduction. Therefore, the Ascentis Express column was chosen to be used in the evaluation of the ionization mechanisms in either quantitative or qualitative experiments using off-line extraction configuration and, in all results obtained, the ESI ionization was less susceptible to ME than APCI. The assays of biological samples spiked before and after the off-line clean-up procedures also provided results for recovery (RE) and process efficiency (PE). For the sample preparation using the on-line RAM-C8-BSA column (5,0 x 0,46 cm I.D.; 10 μm , 100 \AA) two methods were developed: 1) single mode and 2) multidimensional configuration of analysis, with the C18 Ascentis Express in the second chromatographic dimension. In these procedures the ESI ionization was the ionization source employed. The ME was measured for RIF (500 ng/mL) and when the microsomal fractions was the biological fluid, the multidimensional configuration allowed a reduction of ME from 47.86 % to 14.63 % by comparing to the single mode result. For the human plasma was not possible to obtain a ME profile since this

comparison was hampered by the unidimensional data (RSD = 38.73 %). In most cases, when the results obtained from microsomal fractions and human plasma were compared, there was no predominant ME correlation between both matrices for all extraction procedures off-line and on-line. In this work, the rifampicin LC-MS/MS analysis was performed in positive ion mode, monitoring the m/z 823 \rightarrow 791 transition.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiv
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC) e Espectrometria de Massas (MS)	2
1.1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC)	2
1.1.2 – Espectrometria de Massas (MS)	3
1.1.3 – Hifenação: Sistema LC-MS	4
1.2 – Espectrometria de Massas: Modos de Detecção	7
1.3 – Efeito de Matriz em Análises por LC-MS	8
1.4 – Pré-tratamento de Matrizes Biológicas	15
1.4.1 – Amostras Biológicas	15
1.4.2 – Preparo de amostra <i>off-line</i> : Extração em fase sólida (SPE) e Precipitação de proteínas (PP)	16
1.4.3 – Preparo de amostra <i>on-line</i> : Colunas de Meio de Acesso Restrito (RAM)	18
1.5 – Cromatografia Líquida Multidimensional	20
1.6 – Fármacos Antituberculose	21
2 - OBJETIVOS	24
2.1 – Objetivos Específicos	25
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1 – Equipamentos Empregados	27
3.2 – Materiais Utilizados	28
3.3 – Amostras Biológicas e Animais	29
3.4 – Métodos	29
3.4.1 – Generalidades	29
3.4.2 – Obtenção das frações microssomais: extração por Centrifugação Diferenciada	31
3.4.3 – Frações Microssomais: determinação da concentração protéica	32
3.4.3.1 – Preparo das soluções de BSA	32
3.4.3.2 – Preparo do reagente de Bradford	32
3.4.3.3 – Determinação da concentração protéica das frações microssomais	32

3.4.4 – Empacotamento da coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5 µm e 100 Å)...	33
3.4.5 – Otimização das condições LC-MS/MS para as colunas C18 Ascentis Express e Nucleosil.....	33
3.4.5.1 – Condições LC-MS/MS para coluna C18 Ascentis Express.....	34
3.4.5.2 – Condições LC-MS/MS para coluna C18 Nucleosil.....	37
3.4.6 – Procedimentos de preparo de amostra <i>off-line</i>	38
3.4.6.1 – Extração em fase sólida (SPE).....	38
3.4.6.2 – Precipitação de proteínas (PP).....	39
3.4.7 – Avaliação do Efeito de Matriz: preparo de amostra <i>off-line</i>	40
3.4.7.1 – Estudo quantitativo.....	40
3.4.7.2 – Estudo qualitativo.....	41
3.4.8 – Preparo de amostra <i>on-line</i>	42
3.4.8.1 – Preparo da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å)	42
3.4.8.1.1 – Primeira etapa: empacotamento da coluna.....	42
3.4.8.1.2 – Segunda etapa: Imobilização da proteína BSA.....	42
3.4.8.2 – Avaliação da eficiência de exclusão protéica das colunas RAM-BSA.....	43
3.4.8.2.1 – Etapa 1: Preparo do reagente de Bradford	43
3.4.8.2.2 – Etapa 2: Preparo das amostras	43
3.4.8.2.3 – Etapa 3: Análise das amostras – medidas espectrofotométricas	44
3.4.8.3 – Coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.).....	45
3.4.8.4 – Procedimentos de preparo de amostra <i>on-line</i>	46
3.4.8.4.1 – Método unidimensional: Coluna RAM-C8-BSA.....	46
3.4.8.4.2 – Método cromatográfico multidimensional: Coluna RAM-C8-BSA acoplada à coluna C18 Ascentis Express.....	47
3.4.8.5 – Condições LC-MS/MS para coluna RAM-C8-BSA na configuração simples e multidimensional	49
3.4.9 – Avaliação do Efeito de Matriz: preparo de amostra <i>on-line</i>	50
3.4.10 – Tratamento de resíduos	50
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1 – Matrizes Biológicas	52
4.2 – Determinação da Concentração Protéica das Frações Microssomais	53
4.3 – Análise da Rifampicina por LC-MS/MS.....	55
4.4 – Efeito de Matriz: Pré-tratamento <i>Off-line</i> de Amostras	58
4.4.1 – Determinação quantitativa do Efeito de Matriz	58
4.4.2 – Diferentes fontes de ionização: ESI vs. APCI.....	69

4.4.2.1 – Determinação qualitativa do ME por experimento de infusão pós coluna: ESI vs. APCI	80
4.5 – Colunas RAM-BSA	88
4.5.1 – Obtenção e avaliação das colunas RAM-BSA.....	88
4.5.2 – Seleção da coluna RAM-BSA	91
4.5.3 – Coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.).....	92
4.5.4 – Desenvolvimento do método analítico unidimensional	94
4.5.5 – Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.).....	97
4.5.6 – Coluna RAM-C8-BSA e C18 Ascentis Express: método multidimensional de análise	99
4.6 – Efeito de Matriz: Pré-tratamento <i>On-line</i>	101
4.6.1 – Determinação quantitativa do Efeito de Matriz	101
4.6.2 – Coluna RAM-C8-BSA no modo unidimensional vs. multidimensional.....	102
5 – CONCLUSÕES	106
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

INTRODUÇÃO

*"Se você quer transformar o mundo,
experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal
e realizar inovações no seu próprio interior".*

Dalai Lama

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC) e Espectrometria de Massas (MS)

1.1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC)

A cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) é uma técnica analítica amplamente empregada que tem por objetivo a separação de componentes de uma mistura. A LC é composta por duas fases imiscíveis, a fase estacionária e a fase móvel. Quando uma amostra é introduzida em uma coluna cromatográfica, mecanismos físicos e/ou químicos de interação dos analitos com estas duas fases ocorrem de modo a promover a migração diferencial de cada substância existente na mistura (DEGANI *et al.*, 1998). Desta forma, um composto que possui uma interação fraca com a fase estacionária terá um tempo de retenção pequeno e eluirá rapidamente da coluna, já para um composto que apresentar uma interação forte com a fase estacionária, o inverso será observado.

A identificação de substâncias por LC é baseada na comparação de suas características retensivas, ou seja, o tempo de retenção da molécula em estudo com relação ao composto referência, determinado nas mesmas condições cromatográficas (ARDREY, 2003).

A grande possibilidade de combinações entre as fases móveis e estacionárias fizeram da LC uma ferramenta analítica versátil, de grande aplicação e amplamente difundida em diferentes setores da indústria química (DEGANI *et al.*, 1998).

Em trabalho realizado por MARTIN e SYNGE (1941) a cromatografia líquida foi empregada para realizar a separação de acetil aminoácidos. Neste estudo, os autores sugeriram que uma maior eficiência cromatográfica é obtida com o uso de partículas com tamanho bastante reduzido e alta pressão no LC. Dessa forma, iniciou-se o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Na Figura 1.1 encontra-se um esquema de um sistema de HPLC.

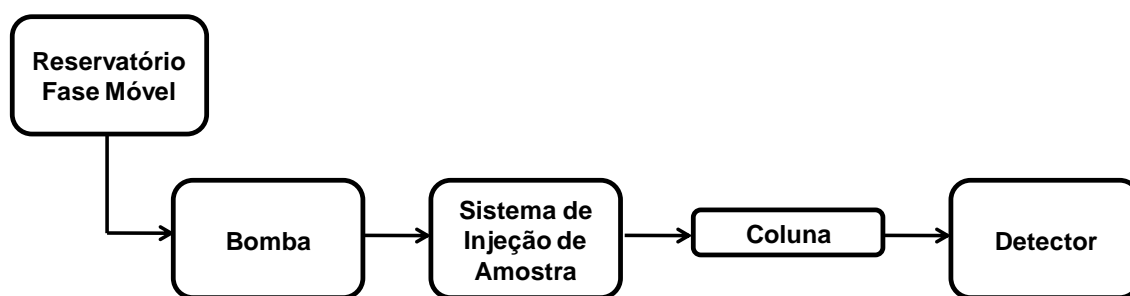


FIGURA 1.1 – Diagrama de blocos para um sistema de HPLC.

Inicialmente, a principal dificuldade no progresso da LC foi a falta de um detector sensível. Porém, no decorrer dos anos, o desenvolvimento da instrumentação levou esta técnica a um melhor desempenho em termos de resolução, quantificação e com inúmeros detectores possíveis de serem acoplados ao sistema cromatográfico, como por exemplo, o ultravioleta-visível, detector de arranjo de diodos, fluorescência, espalhamento de luz, espectrômetro de massas, dentre outros (CASS e DEGANI, 2001).

1.1.2 – Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é uma técnica instrumental que tem como princípio a conversão de moléculas da amostra em íons gasosos, promovendo sua seleção através da razão massa/carga (m/z), para então poderem ser detectados (SKOOG e LEARY, 1992).

O diagrama de blocos na Figura 1.2 mostra os principais componentes de um espectrômetro de massas. A amostra é introduzida pelo sistema de inserção, podendo ser este uma bomba seringa ou um sistema de cromatografia líquida ou gasosa, dentre outros, dependendo das características do analito. Depois, segue para a fonte de ionização, onde as moléculas são convertidas a íons. O analisador de massas realiza a discriminação dos íons por meio de sua razão massa/carga (m/z). Na seqüência, ocorre a detecção através da conversão do feixe iônico em um sinal elétrico, que pode ser então processado. Um ponto importante dos espectrômetros de massas é o requerimento de um elaborado sistema de vácuo para que o sistema se mantenha a baixas pressões (10^{-4} a 10^{-8} torr) nas regiões do analisador, detector e conversor de sinal (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; SKOOG e LEARY, 1992).

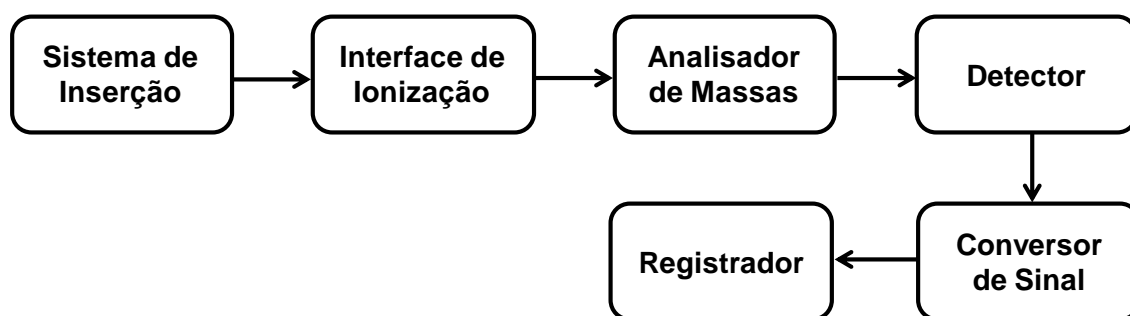


FIGURA 1.2 – Diagrama de blocos para um sistema de MS.

A espectrometria de massas é útil em estudos quantitativos e análises qualitativas, para a elucidação e identificação estrutural de substâncias, e apresenta grande versatilidade não só por ser aplicável a uma ampla gama de compostos, mas também pelo fato da disponibilidade comercial de vários tipos de fonte de ionização e analisadores.

O progresso dos métodos experimentais e os refinamentos em instrumentação levaram a um grande aperfeiçoamento da MS em termos de resolução, sensibilidade, faixa de massas e exatidão. Este contínuo avanço tem permitido análises que alcançam limites de detecção muito baixos, na ordem de pico (10^{-12}), fento (10^{-15}) e atomol (10^{-18}). Ademais, o acoplamento direto de técnicas cromatográficas com a espectrometria de massas tem melhorado estes limites para níveis de ato e zeptomol (10^{-21}) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

1.1.3 – Hifenação: Sistema LC-MS

A busca por métodos analíticos cada vez mais eficientes, com um maior número de análises realizadas em um menor tempo, de maior especificidade e sensibilidade, o que é requerido para muitas aplicações, levou ao surgimento de propostas de associação entre técnicas. Isso tem se mostrado uma tendência crescente, e como exemplo bem sucedido tem-se a hifenação da cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas que somam as qualidades de alto poder de separação da LC com a alta sensibilidade e seletividade atribuída à MS.

Um ponto importante na hifenação LC-MS, é a questão da compatibilidade entre às técnicas. Dessa forma, por mais que desde os anos 70 diferentes fontes de

ionização tenham sido desenvolvidas, as interfaces que fazem uso da ionização à pressão atmosférica são as que apresentam maior aplicação para estudos por LC-MS, sendo estas a ionização por electrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), o que pode ser comprovado pelo grande número de artigos na literatura (BARALLA *et al.*, 2011; CÉSAR *et al.*, 2011; GILBERT-LÓPEZ *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2010; TÖLGYESIA *et al.*, 2010). Como representado na Figura 1.3, a escolha por uma dessas duas interfaces depende das propriedades do composto de interesse, sendo a ESI adequada para análise de moléculas iônicas de alta polaridade e de maior massa molecular, enquanto que a APCI tem se mostrado apropriada para substâncias de polaridade intermediária e de menor massa molecular.

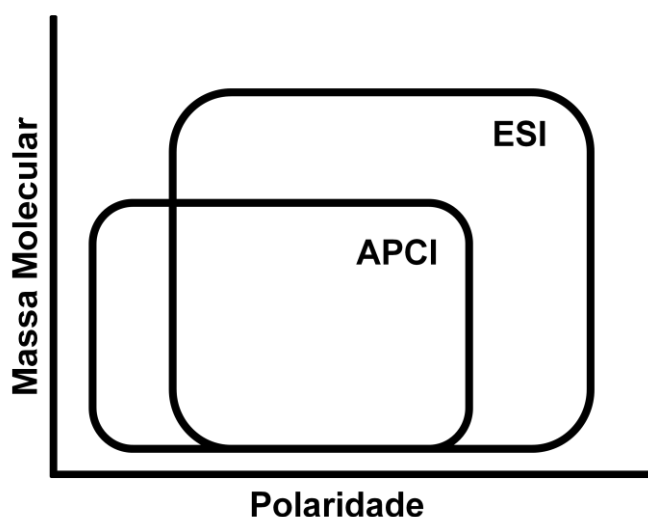


FIGURA 1.3 – Relação entre a massa molecular e polaridade do analito com o tipo de mecanismo de ionização (MAURER, 1998).

Na ESI, o efluente do LC entra no espectrômetro atravessando um capilar, no qual um alto potencial elétrico é aplicado de modo a proporcionar a ionização das moléculas presentes na fase líquida. O fluxo ingressante também é assistido por um gás nebulizador, o qual auxilia na formação de gotas carregadas estáveis. O líquido contendo o analito é então dispersado em um fino aerossol. À medida que o solvente evapora, o campo elétrico interno das gotas aumenta, até chegar a valores críticos, nesse momento, ocorre uma explosão coulômbica, ou seja, os íons são emitidos, e depois estes são focalizados para o analisador de massa. Pelo fato da ionização envolver uma extensa evaporação do solvente, misturas de água com

modificadores orgânicos voláteis, como por exemplo, acetonitrila e metanol, são os típicos solventes escolhidos para a ionização por ESI. Por isso, a cromatografia em fase reversa é o modo de separação mais conciliável com a espectrometria de massas (COVEY *et al.*, 2009; HIRABAYASHI, 1998; KEBARLE e VERKERK, 2009).

Diferentemente do mecanismo de ionização por *electrospray*, na interface de ionização por APCI, o analito é ionizado quando este se encontra em estado gasoso. A fase móvel proveniente do sistema cromatográfico é aquecida e evaporada, e ao mesmo tempo um gás nebulizador é inserido. Depois, este fluxo se encontra com uma agulha, na qual uma alta voltagem é aplicada (processo “*discharge corona*”), assim o gás nebulizador (ar ou nitrogênio) é ionizado formando íons primários, os quais reagem com moléculas do solvente gerando íons reagentes. São estes últimos que reagem com o analito em fase gasosa, para produzir então, os íons correspondentes ao composto alvo (COVEY *et al.*, 2009).

Tanto a ESI quanto a APCI fazem parte da classe das ionizações do tipo *soft* ou brandas, pois a energia transferida aos íons não é tão alta a ponto de promover fragmentações adicionais, assim o espectro obtido apresenta basicamente íons moleculares, não oferecendo muitas informações estruturais (MCLAFFERTY e TURECEK, 1993).

Devido à necessidade de controle da formação de íons, tampões são muito comuns em sistemas LC-MS, e também em infusões diretas no MS. Entretanto, tampões não-voláteis não podem ser empregados, visto que estes podem ser depositados, prejudicando a eficiência de ionização das moléculas de interesse. Dentre os aditivos possíveis de serem usados em MS tem-se o ácido fórmico (FA, do inglês *Formic Acid*), o acetato de amônio, formiato de amônio, dentre outros (NIESSEN, 2006).

De um modo geral, os parâmetros que devem ser avaliados em análises por LC-MS são a vazão, concentração do analito e a composição da fase móvel (força iônica, tipo de solvente e de aditivo), os quais devem ser compatíveis com a interface usada para a hifenação entre as técnicas (KING *et al.*, 2000).

1.2 – Espectrometria de Massas: Modos de Detecção

Como mostrado na Figura 1.2, depois que os íons são gerados, eles são direcionados para o analisador de m/z . O avanço tecnológico da técnica de espectrometria de massas possibilitou o surgimento de diversos tipos de analisadores como quadrupolos (Q), *ion traps* (IT) e *time-of-flight* (TOF). Além disso, este progresso permitiu também o acoplamento entre eles (MS/MS), dando origem aos analisadores híbridos. Alguns exemplos são o quadrupolo-*ion trap* (QTrap) e quadrupolo-*time-of-flight* (QTOF). Quando o espectrômetro é operado na configuração de analisadores em seqüência, tem-se a espectrometria *Tandem* (do inglês, em seqüência) (HOFFMANN, 1996).

Para analisadores de m/z , como o quadrupolo e *ion trap*, dois modos de aquisição podem ser utilizados: a de varredura completa (*full scan*) ou a de seleção de uma relação m/z específica (monitoramento de íons selecionados – SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). Dessa forma, quando analisadores em seqüência são empregados, os modos de detecção são ampliados. É nesse contexto que surgiram os experimentos de MS/MS, os quais utilizam diferentes combinações dos modos de aquisição para obter um maior número de informações da amostra analisada. Na Tabela 1.1 é possível verificar os experimentos que podem ser realizados quando equipamentos com configurações MS/MS são empregados (HOFFMANN, 1996; MAURER, 1998).

TABELA 1.1 – Experimentos de MS/MS^a.

Experimento	Modo de Aquisição	
	1° Analisador	2° Analisador
Íons precursores	<i>Full Scan</i>	SIM
Íons fragmentos	SIM	<i>Full Scan</i>
Monitoramento de Reações Selecionadas (SRM) e Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM)	SIM	SIM
Perda Neutra Constante (CNLS) ^b	<i>Full Scan</i> ^c	<i>Full Scan</i> ^c

^aExperimentos possíveis para um analisador do tipo QqQ; ^bCNLS, do inglês *Constant Neutral Loss Scanning*; ^cModo Sincronizado.

Em métodos analíticos quantitativos, os quais buscam a determinação de analitos presentes em concentrações muito pequenas em matrizes complexas, o experimento mais adequado é o de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) ou Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*), como também é conhecido. Em análises por LC-MS/MS de fármacos e/ou metabólitos em matrizes complexas, experimentos de íons fragmentos são preferíveis, pois a separação cromatográfica pode ser monitorada via SIM no primeiro analisador, enquanto que no segundo analisador informações estruturais são conseguidas após a fragmentação, na cela de colisão, dos compostos de interesse gerando um espectro característico do íon precursor seleccionado (MAURER, 1998; NIESSEN, 2006; SNYDER *et al.*, 1997). Assim, experimentos de MS/MS também auxiliam a questão de pouca informação estrutural associada às fontes de ionização por ESI e APCI.

A fragmentação nos experimentos de espectrometria *Tandem* é conseguida por dissociação as quais ocorrem em uma célula de colisão. Nesta câmara um gás (tipicamente argônio) é adicionado, colidindo com os íons seleccionados, que se fragmentam para aliviar o aumento da energia interna provocado pela colisão. Este processo é denominado de dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision-Induced Dissociation*) (NIESSEN, 2006).

Para equipamentos do tipo QqQ, o primeiro e o terceiro quadrupolos operam como analisadores, enquanto o segundo é a célula de colisão. Dessa forma, neste caso apenas experimentos de MS² podem ser realizados. Para analisadores de massas do tipo *ion trap*, os íons podem ser fragmentados e analisados no próprio *trap* por meio de ciclos de *scan*, adição de gás de colisão e ejeção de íons. Assim, experimentos de MSⁿ podem ser obtidos no *ion trap* e conseqüentemente é possível obter um maior número de informações estruturais sobre as moléculas alvo.

1.3 – Efeito de Matriz em Análises por LC-MS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas *Tandem* é uma ferramenta analítica muito útil na determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em fluidos biológicos. Contudo, o desempenho de métodos por LC-MS com fonte de ionização por ESI ou APCI pode ser comprometido pelo efeito de matriz (ME, do inglês *Matrix Effect*). O ME ocorre

devido à presença de componentes da matriz que coeluem com o analito e que são capazes de afetar sua eficiência de ionização. Dessa maneira, uma cuidadosa avaliação do efeito de matriz deve constituir uma integral e importante parte da validação de qualquer método quantitativo por LC-MS, uma vez que a precisão, exatidão, linearidade de resposta (sinal vs. concentração), limites de quantificação e detecção são afetados por este fenômeno (DAMS e HUESTIS, 2003; GOSETTI *et al.*, 2010; MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

O mecanismo e a origem do efeito de matriz não são completamente elucidados. Dentre as possíveis propostas têm-se que a presença de compostos interferentes menos voláteis pode mudar a eficiência de formação e evaporação das gotas, o que afetaria a quantidade de íons na fase gasosa ou, para os aditivos não-voláteis, partículas sólidas podem ser formadas (ANNESLEY, 2003; CAPPIELLO *et al.*, 2010).

De acordo com MATUSZEWSKI *et al.* (2003), a fonte de ionização deve ser considerada como um reator químico, no qual íons primários reagem com as moléculas do analito em uma série complexa de reações de transferência de carga e de transferência de íons. A velocidade e a eficiência dessas reações são dependentes da energia relativa de ionização, da afinidade por prótons e das moléculas que estão presentes no “reator” em um determinado momento. Por isso, parece ser razoável a proposta de que o efeito de matriz possa ser originado pela competição entre o analito e interferentes, visto que as moléculas da matriz que coeluem também são capazes de reagir com os íons primários. Neste contexto, vale lembrar ainda que aditivos da fase móvel e componentes da matriz podem atuar como reagentes de pareamento iônico, levando a formação de complexos neutros (CAPPIELLO *et al.*, 2010).

Assim, é possível perceber que o efeito de matriz é completamente dependente do meio químico no qual ocorre a ionização da substância alvo, da presença de interferentes, bem como pela forma como a ionização acontece. Diante disso, o ME pode ser reduzido ou eliminado (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003):

- 1) Modificando ou melhorando o procedimento de preparo de amostra para eliminar os interferentes da matriz;
- 2) Melhorando as condições cromatográficas para obter a separação dos analitos de interesse dos compostos endógenos que afetam a eficiência de ionização;

- 3) Avaliando e alterando a interface de ionização do sistema LC-MS e, desta forma, o mecanismo de ionização dos analitos.

A presença de endógenos pode causar dois tipos de efeito de matriz: o de supressão ou de aumento de ionização. A avaliação do efeito de matriz pode ser feita através de experimentos de infusão pós-coluna (que é uma análise qualitativa), ou experimentos quantitativos. No primeiro caso, a configuração instrumental inclui uma bomba seringa conectada via um “T” ao efluente da coluna cromatográfica, ambos os fluxos se misturam e são enviados para o MS, conforme apresentado na Figura 1.4. A bomba seringa contém a solução do analito, o qual é constantemente enviado para o MS. Dessa forma, um sinal relativo à abundância dos íons de interesse é gerado e monitorado. Como linha de base para estes experimentos qualitativos, tem-se o cromatograma obtido quando fase móvel é injetada no LC, visto que a corrente iônica resultante corresponde a nenhum efeito de matriz.

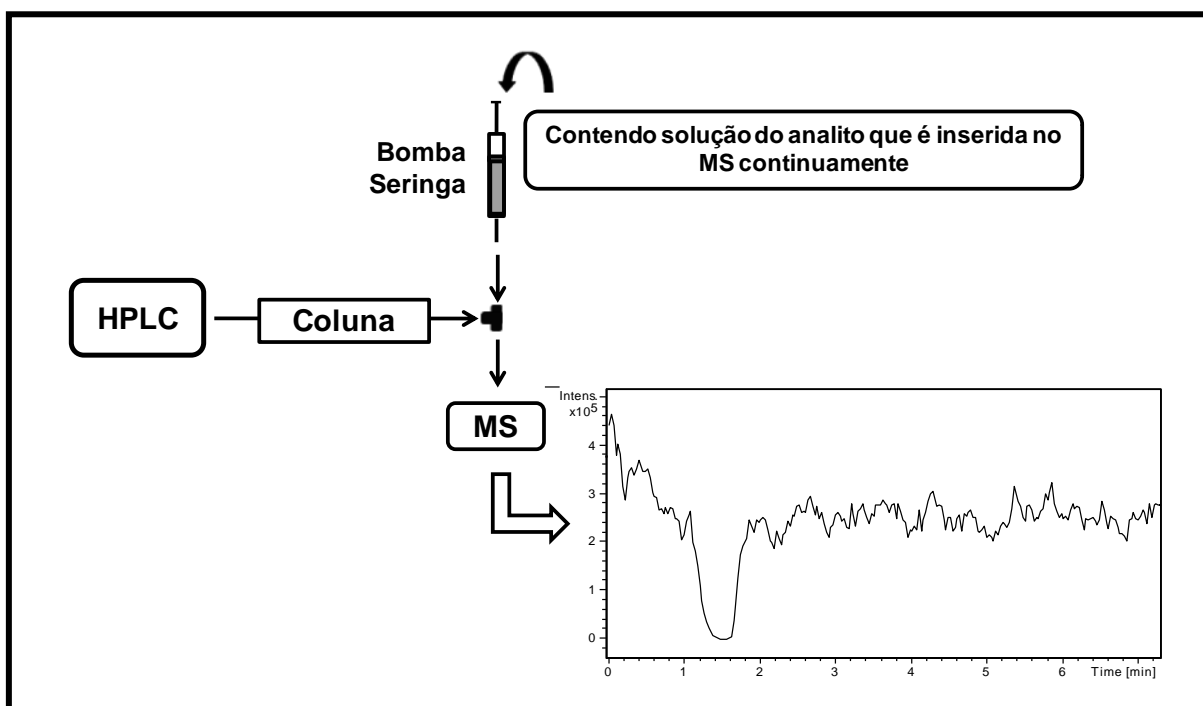


FIGURA 1.4 – Experimentos de infusão pós-coluna, uma avaliação qualitativa do efeito de matriz.

Como ilustrado na Figura 1.5, quando extratos da matriz – interferentes – são injetados no LC, ocorre uma mudança no sinal de abundância dos íons, que pode ser de intensidade maior (a ionização foi favorecida – Figura 1.5 A) ou menor (a ionização foi suprimida – Figura 1.5 B) quando comparado ao cromatograma referência (ANNESLEY, 2003).

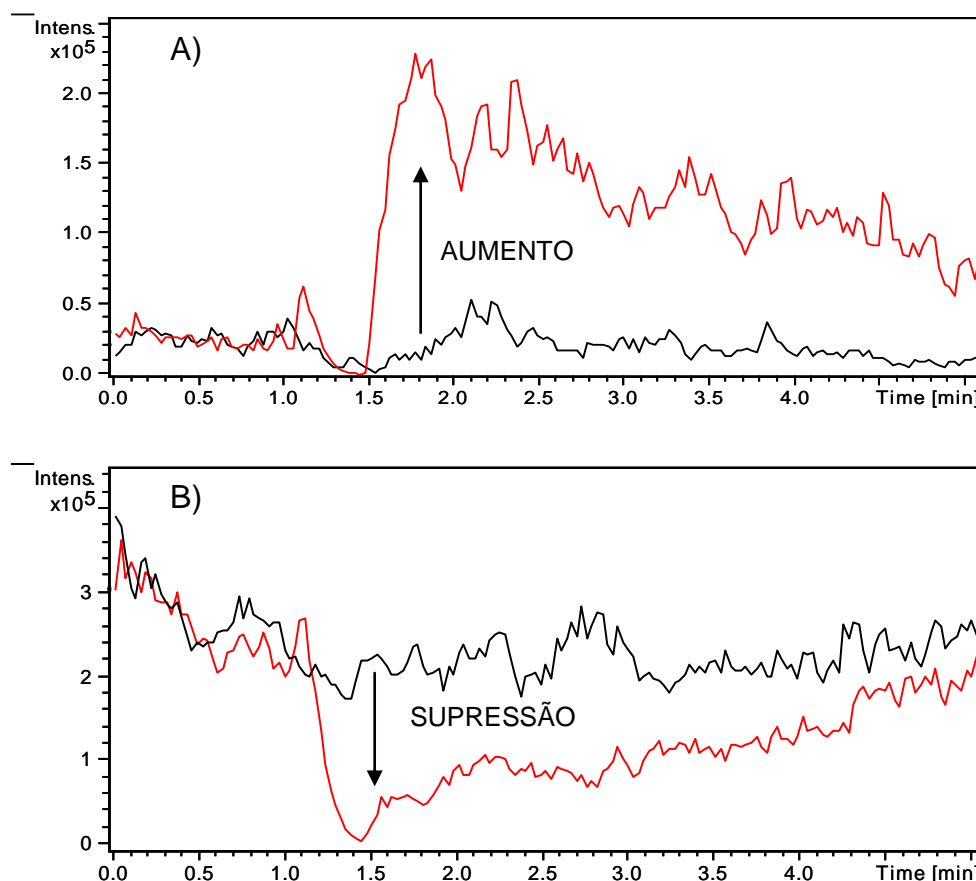


FIGURA 1.5 – Experimentos de infusão pós-coluna para a determinação do efeito de matriz, sendo: (-----) o cromatograma obtido para a injeção de fase móvel, e (-----) o cromatograma obtido para o extrato resultante do preparo de amostra.

A) ME de aumento de ionização; e B) ME de supressão de ionização do analito na presença dos interferentes da matriz.

É grande o número de artigos na literatura que avaliam e discutem o problema do efeito de matriz em diferentes matrizes biológicas (CAPPIELLO *et al.*, 2010; DAMS e HUESTIS, 2003; EECKHAUT *et al.*, 2009; GEORGI e BOOS, 2006; SMERAGLIA *et al.*, 2002).

Em 2006, GEORGI e BOOS a fim de avaliar a eficiência do pré-tratamento de amostras proposto em seu trabalho, realizaram estudos qualitativos de efeito de matriz por LC-MS através de experimentos de infusão pós-coluna. Para isso um

conjunto de oito antidepressivos e dois metabólitos foi analisado utilizando um sistema LC-ESI-MS/MS. O pré-tratamento proposto neste trabalho compreendeu um arranjo completamente automatizado fazendo uso de uma coluna extratora de meio de acesso restrito (de fase reversa) acoplada a uma segunda dimensão de extração, uma coluna de modo misto (fase reversa e troca iônica), depois o eluato era transferido para uma coluna analítica e posteriormente seguia para o MS. Diferentes tipos de matrizes biológicas de diversas espécies (amostras de plasma, soro e urina de origem humana, bovina, suína, e de aves domésticas) foram investigados. Além disso, amostras de plasma humano de um mesmo indivíduo foram coletadas em momentos distintos de um mesmo dia (logo após a refeição e horas depois), para verificar a interferência da composição plasmática na resposta da ionização dos analitos. Os resultados obtidos relevaram que nenhum efeito de matriz foi observado para todos os casos avaliados. Dessa maneira, o sistema de pré-tratamento de amostras proposto mostrou-se altamente seletivo e específico para os compostos investigados, eliminando os interferentes indesejáveis.

Em LC-MS, o efeito de matriz pode ser quantificado por meio de experimentos de fortificação da amostra com o analito após o procedimento de extração. Como valor referência, representativo de nenhum efeito de matriz, tem-se a área do cromatograma obtido quando é injetado no sistema LC-MS a solução do analito em solvente, meio no qual o composto de interesse está livre de interferentes da matriz. Exemplificando, nos cromatogramas apresentados na Figura 1.6, nota-se um ME de supressão de ionização, visto que a área do cromatograma referente ao extrato obtido da matriz fortificada após o preparo de amostra é menor que a área do cromatograma do analito em solvente. Através da relação matemática entre os valores de área das bandas cromatográficas, pode-se determinar o efeito de matriz numericamente (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

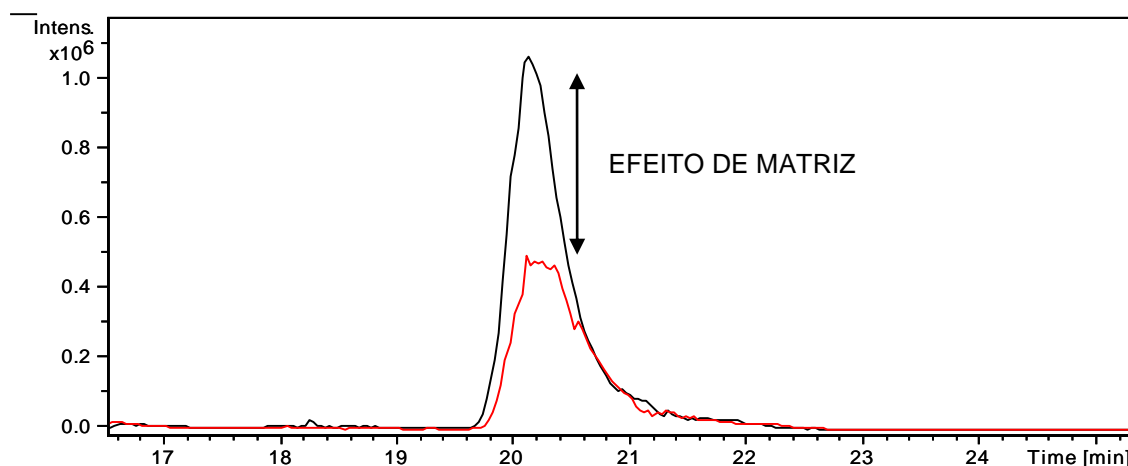


FIGURA 1.6 – Determinação do efeito de matriz por experimentos quantitativos. Cromatogramas (-----) para o analito em solvente; e (-----) para a matriz fortificada com o analito após o procedimento de extração.

Com relação aos interferentes que podem causar o efeito de matriz têm-se os sais, amins, fosfolipídios e compostos endógenos, dependendo da matriz avaliada (CAPPIELLO *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por XIA e JEMAL (2009) foram monitorados por LC-MS/MS fosfolipídios provenientes de amostras de plasma humano e foi investigada a associação dos mesmos com o efeito de matriz de alguns analitos de características básicas, ácidas e neutras. Como preparo de amostra realizou-se precipitação de proteínas. Os experimentos de infusão pós-coluna indicaram que o efeito de matriz observado em determinados tempos de retenção estavam correlacionados com a presença de fosfolipídios.

ANTIGNAC *et al.*, citado por CAPPIELLO *et al.* (2010), propôs classificar os interferentes em dois grupos: supressores endógenos e exógenos. No primeiro caso, estariam os compostos oriundos da matriz, que permaneceram no extrato mesmo após o procedimento de tratamento de amostra. Na classe dos supressores exógenos estariam as substâncias não provenientes da matriz, que foram introduzidas ao longo do método, tais como impurezas do preparo de amostra, modificadores cromatográficos, contaminantes devido ao manuseio das amostras, dentre outros.

Como é possível notar, o ME é reflexo do método LC-MS como um todo, desde a etapa de tratamento da amostra, passando pelas condições cromatográficas, e por fim os parâmetros de ionização determinados na espectrometria de massas. Além disso, as características químicas do analito e a

natureza da matriz também estão diretamente associadas ao ME (Figura 1.7). Segundo a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*), nos casos de procedimentos realizados por LC-MS ou LC-MS/MS, o ME deve ser investigado para assegurar que a precisão, seletividade e sensibilidade não sejam comprometidas.

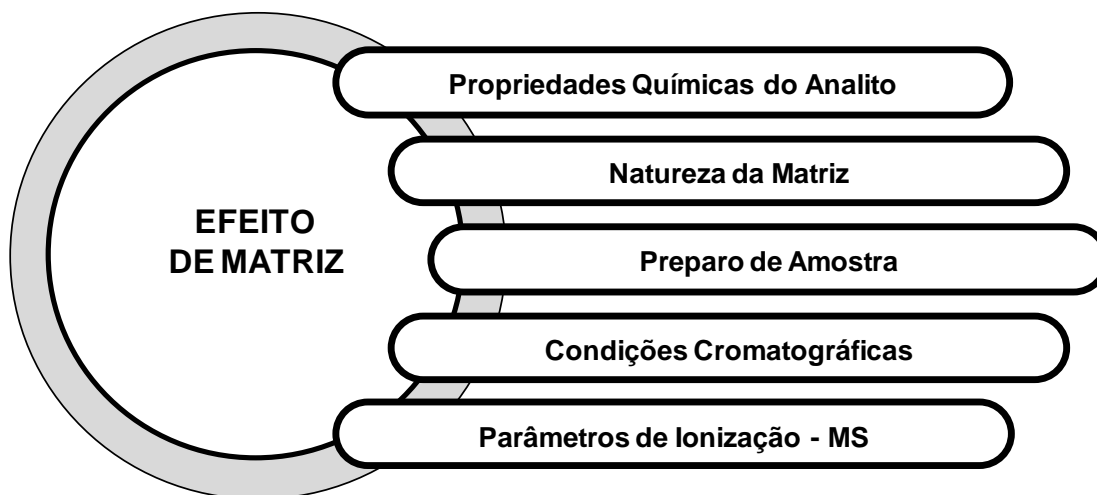


FIGURA 1.7 – Parâmetros associados ao efeito de matriz.

Dentre os estudos pioneiros de investigação do ME tem-se o trabalho de BUHRMAN *et al.* (1996), no qual foi mostrado que a eliminação de interferentes da matriz por meio de um método de preparo de amostra mais eficaz pôde proporcionar a quantificação de concentrações mais baixas em plasma humano de SR 27417, um antagonista de fatores de ativação de plaquetas, uma vez que a supressão de ionização pôde ser minimizada.

A escolha das condições cromatográficas e de interfaces de ionização constitui também parte importante no desenvolvimento de métodos bioanalíticos por LC-MS/MS para que o ME possa ser contornado, como já discutido em vários artigos de revisão encontrados na literatura (CAPPIELLO *et al.*, 2010; EECCKHAUT *et al.*, 2009; TAYLOR, 2005). Através do aumento de fator de retenção (k) de 1,50 para 3,25 para a análise em plasma humano de finasterida, um medicamento antiandrógeno, MATUSZEWSKI *et al.* (1998) praticamente eliminou a supressão de ionização do analito, bem como melhorou a precisão do método LC-MS/MS avaliado. Em estudos qualitativos de determinação do efeito de matriz comparando-se diferentes mecanismos de ionização à pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*), SOUVERAIN *et al.* (2004a) constataram que a

APCI mostrou ser menos susceptível ao ME que a ESI para a análise do fármaco narcótico metadona em plasma humano.

BONFIGLIO *et al.* (1999) realizaram experimentos LC-ESI-MS/MS de infusão pós-coluna para a determinação do efeito de matriz para a análise de três substâncias em plasma canino: cafeína (estimulante), fenacetina (fármaco de ação analgésica e antipirética) e um composto Merck não especificado. Os procedimentos de tratamento de amostra selecionados foram extração em fase sólida, líquido-líquido e precipitação de proteínas. Pelos resultados obtidos foi constatado que para todos os analitos estudados um menor efeito de matriz foi observado quando a extração líquido-líquido foi o método de extração empregado. Ademais, pôde-se notar também que o ME era dependente da natureza química da substância avaliada, sendo obtido um ME mais pronunciado para a análise da cafeína, dentre as três moléculas, a mais polar, enquanto para o composto Merck (o analito menos polar) uma menor supressão de ionização foi observada. Dessa forma, foi demonstrada a relevância dos estudos de ME, uma vez que estes podem fornecer informações e ferramentas para auxiliar o desenvolvimento de métodos quantitativos de análise por LC-MS/MS.

1.4 – Pré-tratamento de Matrizes Biológicas

1.4.1 – Amostras Biológicas

Dentre os biofluidos alvos de estudos científicos, um dos mais extensamente investigado é o plasma humano. Este é a parte líquida do sangue, de coloração amarela, composto de proteínas, nutrientes, hormônios, eletrólitos, fatores coagulantes, gases dissolvidos, e, majoritariamente, água em aproximadamente 91 %. Quando medicamentos são ingeridos, o plasma se encarrega de transportá-los e distribuí-los pelos órgãos humanos (GUYTON e HALL, 2006).

Os microsomas também são importantes matrizes biológicas, uma vez que são amplamente empregados em pesquisas para a investigação do metabolismo *in vitro* de moléculas, e em estudos de interação fármaco-fármaco. Os microsomas são vesículas celulares, localizadas no retículo endoplasmático, que contém um conjunto importante de enzimas, os citocromos P450, os quais são responsáveis pela catálise de uma grande diversidade de reações. Eles podem ser obtidos por

precipitação com a adição de cloreto de cálcio ou por centrifugação diferencial (VOET *et al.*, 2004; WALAWALKAR *et al.*, 2006). Neste último caso, o processo de centrifugação leva inicialmente a decantação dos materiais biológicos de maior peso molecular, como fragmentos celulares, mitocondriais e nucléicos. Ao final, com uma maior rotação, na ordem de 100.000 g, os sedimentos do retículo endoplasmático são depositados e recolhidos (VOET *et al.*, 2004).

1.4.2 – Preparo de amostra *off-line*: Extração em fase sólida (SPE) e Precipitação de proteínas (PP)

A qualidade da etapa de pré-tratamento da amostra é um fator chave em métodos analíticos. Rapidez, exatidão, precisão, consumo de pequenas quantidades de solvente orgânico são características ideais para um bom procedimento de extração. Além disso, para os métodos modernos de tratamento de amostras, outras propriedades são também desejáveis e incluem compatibilidade com a subsequente análise, integridade da amostra e alta frequência analítica (CHEN *et al.*, 2009). Durante a escolha do procedimento de extração, as propriedades físico-químicas da matriz e do composto alvo devem ser cuidadosamente avaliadas para que a seleção da melhor técnica de preparo de amostra seja feita.

Como procedimentos bem estabelecidos e amplamente aplicados no tratamento de amostras biológicas enquadram-se a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), precipitação de proteínas (PP) e o emprego de colunas de meio de acesso restrito (RAM, do inglês *Restricted Access Media*), sendo este último uma tendência mais atual, na qual a etapa de preparo da amostra está acoplada *on-line* com o sistema de análise e detecção (DIONÍSIO *et al.*, 2010; SOUVERAIN *et al.*, 2004b).

A análise de fármacos em fluidos biológicos, como plasma, soro, frações microssomais, exige um pré-tratamento específico devido à grande complexidade destes tipos de matrizes. O fator mais relevante é a presença de proteínas, que além de serem moléculas grandes, o que impossibilita a injeção direta deste tipo de amostra na coluna cromatográfica, os fármacos e/ou os metabólitos encontram-se ligados a elas. Esta ligação pode ser rompida por precipitação através de vários métodos: aquecimento; adição de ácidos, bases, ou solventes orgânicos como: metanol, etanol e acetonitrila. Depois, para que as proteínas precipitadas sejam

separadas, centrifuga-se a mistura e recolhe-se o sobrenadante, o qual pode ser diretamente injetado no sistema cromatográfico ou submetido a outro procedimento de extração. Este tipo de extração é denominado de precipitação de proteínas (PP) e na Figura 1.8 A é mostrado um esquema ilustrativo desta técnica (CASS e DEGANI, 2001).

A extração em fase sólida (SPE) é um método de preparo de amostra efetivo para a remoção de interferentes e enriquecimento do analito. Ela apresenta uma ampla aplicação, seja nas análises de matrizes biológica, ambiental ou alimentícia (STOOB *et al.*, 2005; KANTIANI *et al.*, 2009; BARALLA *et al.* 2011). A eficiência de extração por SPE é determinada pela maior afinidade das substâncias alvo pelo suporte sólido do que pela matriz e/ou eluente (PAVLOVIC *et al.*, 2007). Vários formatos e fases de SPE têm sido desenvolvidos para que ela seja aplicável as mais variadas matrizes e analitos.

Mediante o sucesso da extração em fase sólida na configuração *off-line*, desenvolvimentos tecnológicos foram realizados de modo a possibilitar o acoplamento direto da SPE ao sistema de LC, resultando em um processo *on-line*. Assim, a automatização desta técnica proporcionou uma maior frequência analítica, menor consumo de solventes e diminuição do manuseio da amostra, que por consequência minimiza a perda dos analitos associada a erros humanos de manipulação e a exposição a compostos nocivos. Além disso, a exatidão e precisão do método são melhoradas (CHEN *et al.*, 2009; DIONÍSIO *et al.*, 2010).

A extração em fase sólida, seja na configuração *off-line* ou *on-line*, é constituída por quatro etapas (Figura 1.8 B): 1) Condicionamento, o qual consiste em ativar a fase estacionária com um solvente adequado; 2) Aplicação da amostra, constituída pela matriz contendo o analito de interesse; 3) Lavagem, neste passo objetiva-se a remoção dos interferentes com retenção seletiva dos compostos alvo; 4) Eluição, na qual um solvente apropriado é aplicado de modo que o analito seja eluído e recolhido (CHEN *et al.*, 2009).

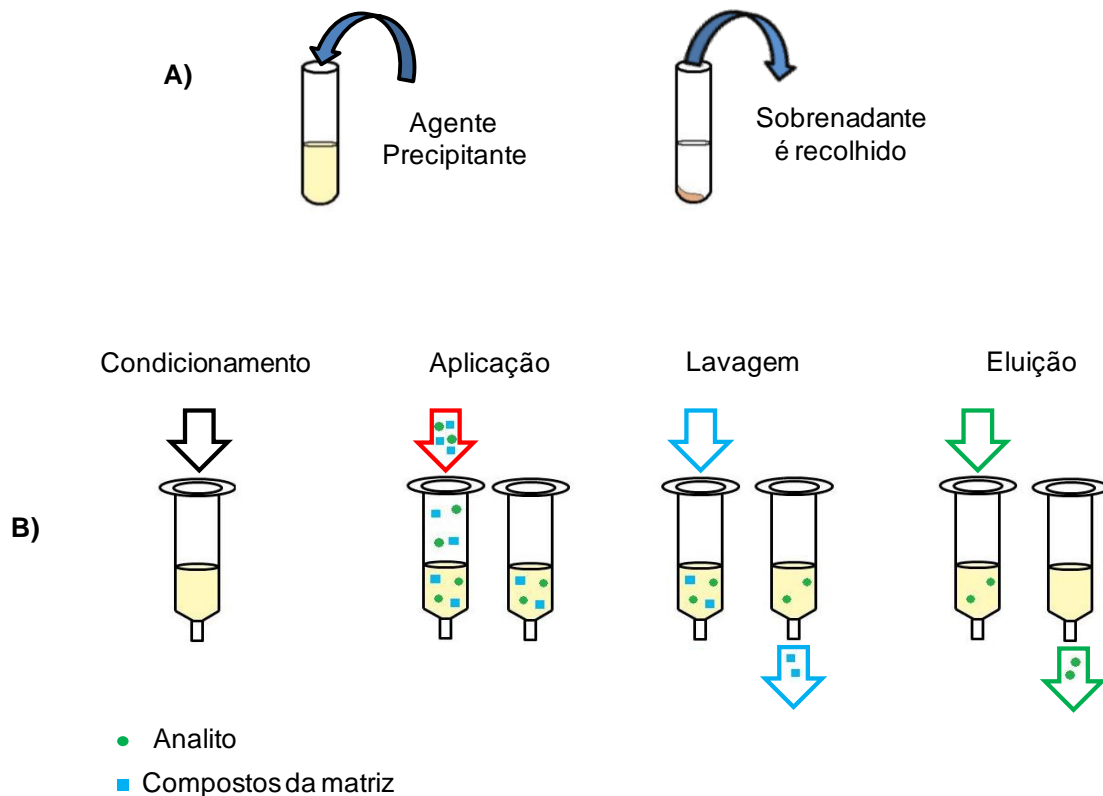


FIGURA 1.8 – Representações esquemáticas das etapas dos preparos de amostra: A) PP e B) SPE.

1.4.3 – Preparo de amostra *on-line*: Colunas de Meio de Acesso Restrito (RAM)

Devido à grande importância da etapa de preparo de amostras no desenvolvimento de métodos analíticos, melhorias que representem um menor manuseio das mesmas e uma alta frequência analítica são desejadas. Um exemplo bem sucedido é o acoplamento do pré-tratamento da amostra com o sistema cromatográfico, originando um processo realizado *on-line*. Dessa forma, muitas vantagens são associadas a este tipo de técnica, além daquelas já citadas, têm-se a automatização e possibilidade de injeção direta de amostras complexas.

Inspirados nos princípios da SPE *on-line*, novos métodos de limpeza de amostra surgiram, porém com fases estacionárias especiais. Neste quadro se insere as colunas de meio de acesso restrito (RAM, do inglês *Restricted Access Media*), as quais promovem o pré-tratamento das amostras baseando-se em mecanismos de

interação com o suporte sólido para garantir a separação de uma determinada substância (CASSIANO *et al.*, 2006; CASSIANO *et al.*, 2009a; CHEN *et al.*, 2009).

Dentre as possibilidades para o pré-tratamento *on-line* de amostras pode-se ainda citar o uso de colunas monolíticas, cromatografia de fluxo turbulento, dentre outras (XU *et al.*, 2006; SEGURA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2009).

Para o estudo de matrizes biológicas, as colunas de meio de acesso restrito têm se mostrado uma boa alternativa, pois são capazes de excluir macromoléculas, como as proteínas, retendo apenas as moléculas de menor peso molecular. Em colunas do tipo RAM, a superfície externa da sílica é coberta por uma rede hidrofílica, enquanto dentro dos poros dessas partículas atuam interações hidrofóbicas, iônicas ou de afinidade. Devido ao tamanho desses poros apenas micromoléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos, já que uma barreira de difusão física impede que as macromoléculas consigam adentrar esses poros. Vale lembrar que quando a amostra é injetada em colunas deste tipo ocorre também uma barreira de difusão química que é responsável não só pela retenção das micromoléculas, mas também pela não adsorção das macromoléculas. Assim, as fases estacionárias do tipo RAM combinam os princípios da Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa ou de Troca Iônica (CASSIANO *et al.*, 2006; CASSIANO *et al.*, 2009a; SOUVERAIN *et al.*, 2004b).

As colunas de meio de acesso restrito também podem ser facilmente preparadas em laboratório. LIMA *et al.*, 2006, relataram o procedimento de preparo de colunas RAM proteína-imobilizada do tipo albumina sérica bovina (RAM-BSA, do inglês *Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin*). Neste estudo investigou-se a retenção de fármacos ácidos, básicos e neutros e a capacidade de exclusão protéica quando amostras de plasma humano eram diretamente injetadas nas fases RAM. As colunas RAM-BSA sintetizadas foram eficientes na exclusão das macromoléculas e apresentaram fatores de retenção (k) adequados para os analitos estudados.

Na Figura 1.9 é mostrada uma representação esquemática para fases RAM, mais especificamente neste caso as proteína-imobilizadas do tipo BSA, e um esquema simplificado do mecanismo de exclusão protéica.

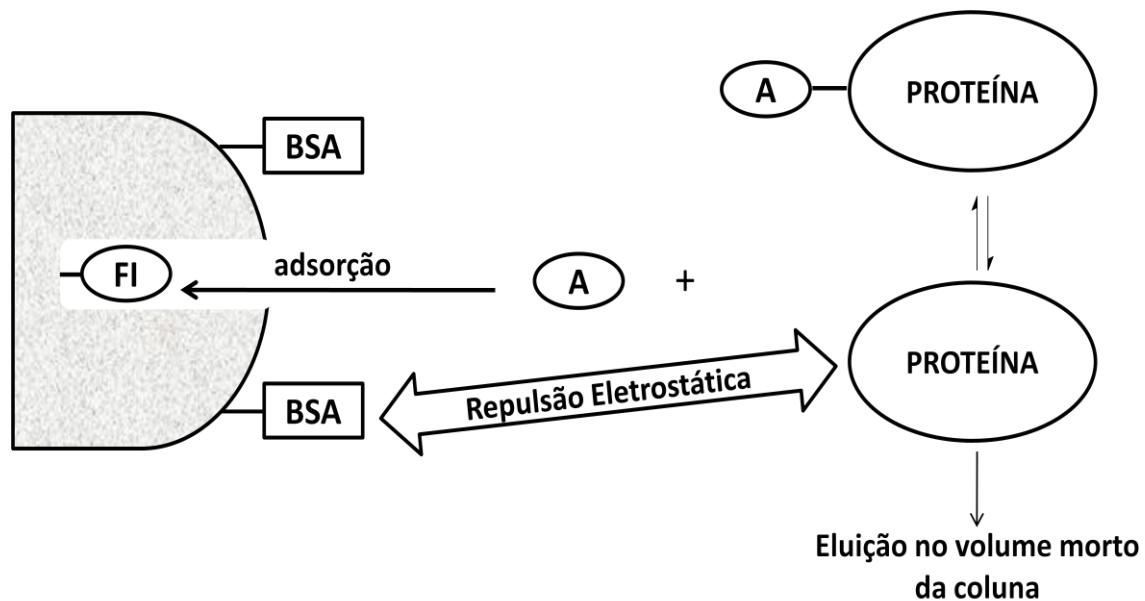


FIGURA 1.9 – Representação esquemática das fases RAM-BSA e seu mecanismo de exclusão, sendo (A) o analito, e (FI) a fase de interação presente no interior do poro.

Como principais vantagens das colunas RAM têm-se: automatização, grande número de análises por tempo, possibilidade de injeção direta e repetida da amostra não tratada. As possibilidades de aplicação de colunas RAM não se restringem apenas as análises de fármacos em biofluidos, podendo, por exemplo, ser empregada em estudo de águas (BARREIRO *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2009) e análise de alimentos (CHICO *et al.*, 2008).

As colunas RAM podem ser usadas na configuração simples ou acopladas a uma coluna analítica (funcionando como uma pré-coluna). Por isso muitas vezes o emprego deste tipo de colunas extratoras está associado à Cromatografia Multidimensional, já que as colunas RAM quase sempre apresentam uma baixa eficiência cromatográfica, sendo necessária a adição de mais uma dimensão para obter a seletividade desejada (LIMA *et al.*, 2006).

1.5 – Cromatografia Líquida Multidimensional

Dentre as grandes tendências em LC, a Cromatografia Multidimensional ou 2D tem se mostrado uma proposta sólida. Ela é resultado da soma de diferentes mecanismos de separação cromatográfica que podem estar diretamente acopladas (configuração *on-line*) ou não (configuração *off-line*). Dessa forma, o sistema

cromatográfico formado se torna ainda mais seletivo para uma determinada molécula (FRANÇOIS *et al.*, 2009; SHELLIE e HADDAD, 2006).

Apesar dos progressos feitos para otimizar o potencial da cromatografia unidimensional (1D), em muitos casos essa ainda não possui a sensibilidade e poder de resolução cromatográfica necessária para a análise de diferentes constituintes em uma mistura complexa, onde os analitos de interesse estão presentes em quantidades cada vez menores. Assim, o desenvolvimento da cromatografia multidimensional (2D) tem ganhado especial atenção para a separação de misturas complexas (FRANÇOIS *et al.*, 2009; MULLETT, 2007).

Dependendo da maneira como a transferência dos analitos é feita entre as colunas cromatográficas de dimensões diferentes de separação, a cromatografia 2D pode ser denominada *off-line* ou *on-line*. No primeiro caso, frações do eluato da primeira coluna são coletadas (manualmente ou via coletor de frações) e, depois de concentradas, são re-injetadas na segunda coluna cromatográfica. A LC multidimensional *on-line*, por sua vez, é constituída de um arranjo instrumental mais elaborado, pois neste caso as colunas são acopladas por um sistema de válvulas que realiza a transferência direta do eluato da primeira coluna para a segunda (FRANÇOIS *et al.*, 2009). Assim, perdas de analitos e riscos de contaminação são minimizados, com o benefício de aumento de reprodutibilidade, menor tempo de análise e redução de volumes de solventes orgânicos utilizados (FRIED e WAINER, 1997).

A cromatografia multidimensional também tem se mostrado útil na otimização de métodos de preparo de amostra, visto que na primeira dimensão pode ser empregada uma coluna extratora, para a remoção dos interferentes, enquanto na segunda dimensão, os analitos são separados e analisados (GEORGI e BOOS, 2006).

1.6 – Fármacos Antituberculose

A tuberculose é uma doença contagiosa causada pela inalação do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium TB*), ainda de grande impacto na população. Algumas projeções indicam que a TB permanecerá como uma das 10 maiores causas de mortes em adultos no mundo no ano de 2020 (NG *et al.*, 2007). A terapia medicamentosa para a tuberculose envolve um árduo processo de

quimioterapia de longa duração envolvendo a administração de dois ou mais medicamentos e que, por muitas vezes, apresenta efeitos colaterais indesejáveis (NG *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2005). É por esse motivo, que o tratamento da TB apresenta índices de abandono de cerca de 20 % dos casos; ocasionando o aparecimento de microorganismos resistentes e conseqüente agravamento da doença (DOUGLAS e MCLEOD; citado por ROSA, 2006).

A rifampicina, isoniazida e pirazinamida são os fármacos de primeira escolha para a quimioterapia da tuberculose e compõem o sistema designado como RHZ (GONG *et al.*, 2009).

Como a tuberculose é uma realidade mundial e, principalmente, em países em desenvolvimento como o Brasil, estudos envolvendo a análise dos fármacos RHZ em matrizes biológicas são de extrema importância e, desta forma, a rifampicina (RIF) foi selecionada como fármaco modelo para o desenvolvimento deste trabalho.

A Figura 1.10 apresenta a estrutura química molecular da RIF, cuja massa molecular é 823,95 g/mol.

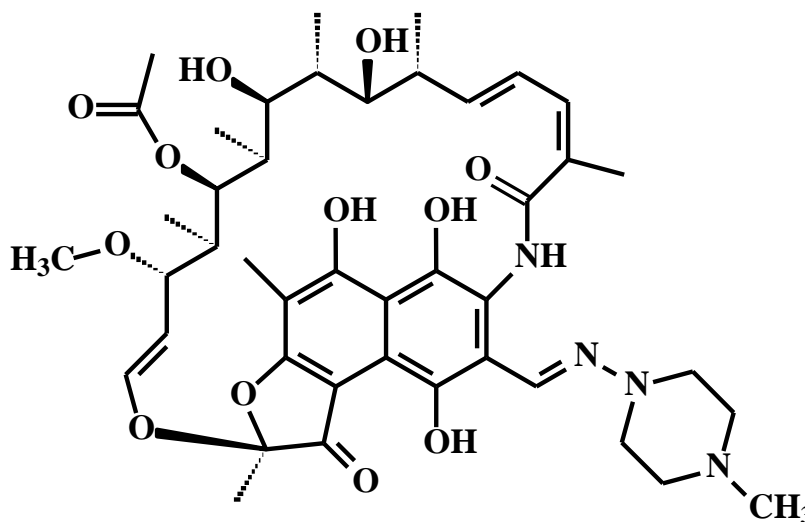


FIGURA 1.10 – Estrutura molecular da rifampicina.

A rifampicina, análogo semi-sintético da rifamicina B, é um potente indutor das enzimas hepáticas, e pertence ao grupo dos antibióticos macrocíclicos. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. São necessárias altas concentrações de RIF para que ela exerça

sua ação bactericida sobre microorganismos intra e extracelulares (GOODMAN e GILMAN, citado por ROSA, 2006). Clinicamente, a RIF é empregada principalmente em associação com outro antibiótico, uma vez que as bactérias podem desenvolver altos níveis de resistência quando a rifampicina é administrada isoladamente no tratamento da tuberculose. A dose diária oral padrão de RIF é de 600 mg, e o tempo de meia-vida para a excreção plasmática deste fármaco é de 3 a 5 horas (BAO *et al.*, 2008; ELLARD e FOURIE, 1999).

OBJETIVOS

*“O objetivo da vida não é só ser feliz.
É ser útil, honrado, compassivo, fazendo com que nossa vida,
bem vivida, faça alguma diferença”.*

Ralph Waldo Emerson

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho de mestrado teve por objetivo conduzir experimentos sistemáticos, necessários no desenvolvimento de métodos quantitativos por LC–MS/MS, a fim de avaliar o efeito de matriz na análise de rifampicina em fluidos biológicos, investigando-se diferentes procedimentos de preparo de amostra, eficiências cromatográficas, mecanismos de ionização e matrizes biológicas.

2.1 – Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de matriz na análise de rifampicina em plasma humano e em frações microssomais extraídas de fígados de rato;

Avaliar o efeito de matriz na análise de rifampicina em fluidos biológicos investigando-se diferentes métodos de preparo de amostra, o que inclui a configuração *off-line* (SPE e PP) e *on-line* com emprego de colunas RAM-BSA no modo simples e multidimensional de análise;

Avaliar o efeito de matriz na análise de rifampicina em fluidos biológicos empregando-se como condição cromatográfica uma fase estacionária convencional (5 μm , 100 \AA) ou uma coluna com tecnologia *Fused Core* (2,7 μm partícula, 90 \AA);

Avaliar o efeito de matriz na análise de rifampicina em fluidos biológicos investigando-se diferentes fontes de ionização a pressão atmosférica (ESI e APCI).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".*

Leonardo da Vinci

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Equipamentos Empregados

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia da marca SHIMADZU, equipado com duas bombas LC-20AD, válvula seletora de solvente FCV-10 ALvp, degaseificador de membrana DGU-20A5, auto-injetor SIL-20A, válvula de seis caminhos VALCO, interface CBM-20A, detector UV-Vis. Foi utilizado um espectrômetro de massas ESQUIRE 6000 *Ion Trap* da marca BRUKER DALTONICS, com disponibilidade de fontes de ionização por ESI ou APCI. Os dados foram adquiridos via *software* DATA ANALYSIS para MS e o CLASS-VP para o HPLC.

Uma empacotadora SHANDON foi empregada para empacotar as fases estacionárias.

As medidas de absorvidade molar foram feitas na região do Ultravioleta-visível e realizadas utilizando-se um espectrofotômetro V630 da marca JASCO, e cubetas de vidro, e de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Um *Speed Vac Concentrator* da marca THERMO SCIENTIFIC foi usado para concentração de soluções.

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, sendo este adequadamente calibrado com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS). As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca EPPENDORF.

Os fígados picados e adicionados ao tampão foram homogeneizados com um homogeneizador IKA, modelo ULTRA-TURBAX T10. As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i e uma ultracentrífuga SORVALL ULTRA modelo PRO 80. A etapa de ultracentrifugação foi realizada no Laboratório de Química, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araraquara.

Os solventes utilizados no preparo das fases móveis foram degaseificados em ultra-som BRANSONIC modelo 1510R.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

3.2 – Materiais Utilizados

Solventes, grau HPLC, foram utilizados nas análises cromatográficas (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA). Para o preparo das fases móveis as proporções dos solventes foram medidas na relação volume/volume.

No preparo de todas as soluções aquosas e na limpeza dos materiais foi utilizada água deionizada através do aparelho Milli-Q da MILLIPORE.

A seguir têm-se listado as substâncias químicas utilizadas no presente trabalho:

- Acetato de amônio (grau HPLC $\geq 99,0$ %), J. T. BAKER;
- Ácido fórmico (P.A. grau MS), FLUKA;
- Ácido fosfórico concentrado (85 % P.A.), J. T. BAKER;
- Albumina sérica bovina (*fraction V powder, minimum 98* %), SIGMA;
- Borohidreto de sódio (98 % P.A.), MERCK;
- Cartuchos Oasis HLB 1cc, 30 mg *flangeless*, WATERS;
- Cloreto de sódio (99,9 % P.A.), J.T. BAKER;
- Corante Comassie *Brilliant Blue* (P.A.), MALLINCKRODT;
- Fosfato de sódio monobásico (98 % P.A.), MALLINCKRODT;
- Fosfato de sódio dibásico (P.A.), J.T. BAKER;
- Glutaraldeído 25 %, ACROS;
- Fluoreto de fenil-metil-sulfonil (P.A.), SIGMA;
- Rifampicina, concedida pela Empresa Sanofi-Aventis,
- Sacarose (P.A.), MALLINCKRODT.

As sílicas utilizadas no empacotamento das colunas foram:

- Sílica C18 Nucleosil (5,0 μm , 100 Å);
- Sílica C8 Nucleosil (10,0 μm , 100 Å);
- Sílica C18 Luna (10 μm e 100 Å).

As colunas analíticas empregadas foram:

- C18 Ascentis Express[®] *Fused Core* Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm , 90 Å), SIGMA-ALDRICH;
- C18 de sílica Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 μm , 100 Å) *homemade*.

3.3 – Amostras Biológicas e Animais

Neste trabalho, foram utilizados plasma humano e frações microssomais provenientes de ratos Wistar.

Os ratos Wistar de 6 - 8 semanas eram mantidos em sala apropriada, livre de patógenos, em ar limpo, e suplemento de água (*ad libitum*). A temperatura foi mantida entre 20 – 23 °C, com umidade relativa de aproximadamente 50 % e ciclos de luz e escuridão de 12 h. Estes animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de São Carlos, laboratório no qual foi realizada também a extração dos fígados dos ratos. Alguns fígados foram cedidos pelo Laboratório de Plasticidade Muscular, Departamento de Fisioterapia, da UFSCar. O uso dos animais para obtenção dos homogenatos de fígado foi conduzido de acordo com protocolo aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 024/2007).

O plasma humano utilizado neste estudo foi fornecido pelo Hemonúcleo Regional do Hospital Universitário São Francisco, Bragança Paulista, SP e devidamente armazenado em *freezer* a – 20 °C.

Em todos os procedimentos foi empregado plasma humano na sua forma *in natura* (sem diluição), exceto no caso da SPE. Utilizou-se frações microssomais diluídas para a concentração protéica de 10 mg/mL em água.

3.4 – Métodos

3.4.1 – Generalidades

A seguir serão apresentados os procedimentos experimentais e os métodos utilizados no desenvolvimento dos estudos de efeito de matriz na análise da rifampicina nas matrizes plasma humano e microssomal. Para estes estudos, as seguintes variáveis foram investigadas:

- Diferentes pré-tratamentos de amostra:

Off-line: SPE, PP com ACN e com MeOH;

On-line: coluna RAM no modo unidimensional, e no modo multidimensional, acoplada a uma coluna C18 Ascentis Express;

- Diferentes parâmetros cromatográficos:
 Coluna C18 Ascentis Express® *Fused Core* Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μm , 90 Å);
 Coluna preparada com sílica C18 Nucleosil (*homemade*) (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 μm , 100 Å);
- Diferentes fontes de ionização:
 ESI e APCI.

Devido ao grande número de variáveis, muitas associações entre elas são possíveis. Porém, apenas algumas combinações foram realizadas, e estas se encontram na Figura 3.1.

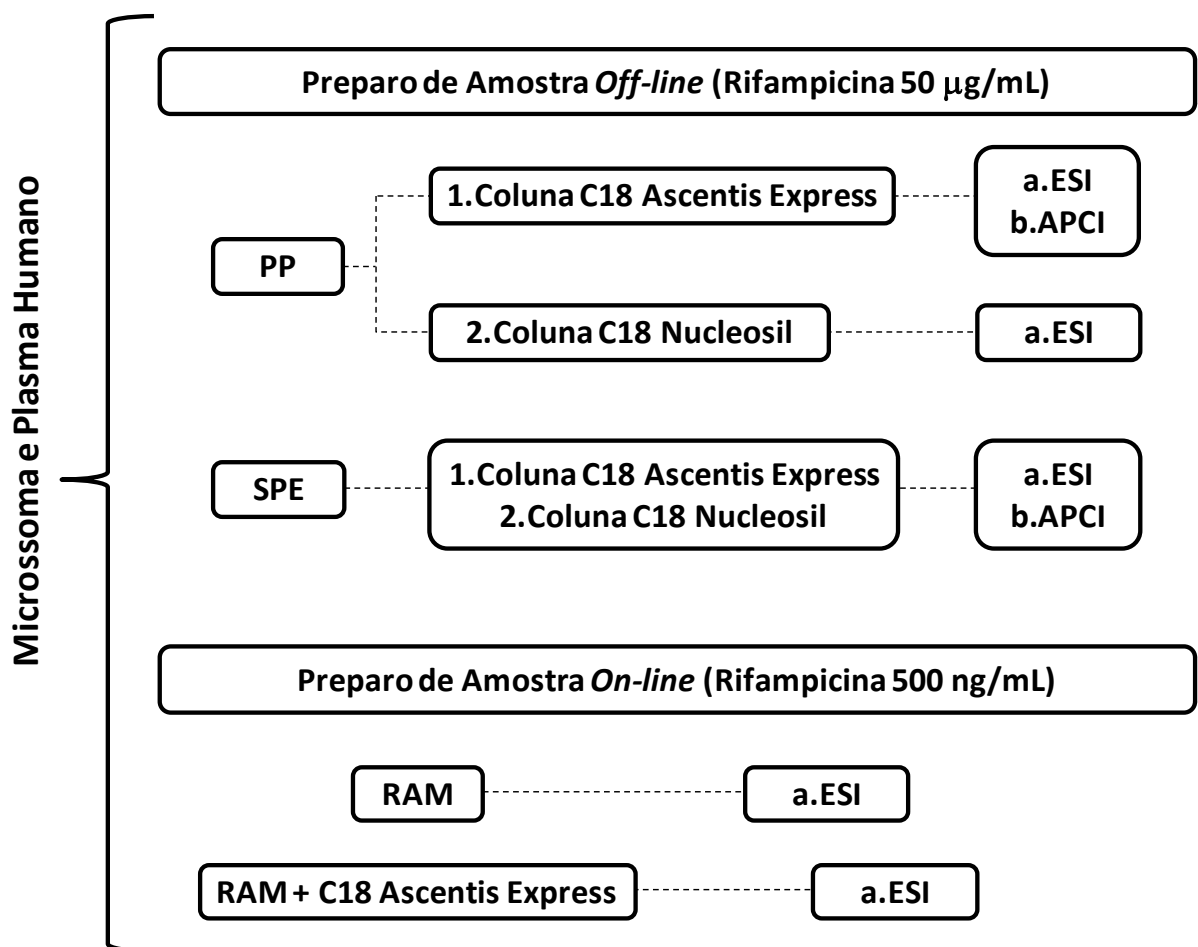


FIGURA 3.1 – Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz.

3.4.2 – Obtenção das frações microssomais: extração por Centrifugação Diferenciada

Os fígados foram extraídos conforme descrito na literatura (PHILLIPS e SHEPHARD, 1998; PRASAD e SINGH, 2009) com algumas modificações. De maneira geral, os ratos foram colocados com a face ventral para cima e uma larga incisão foi realizada no animal, de modo a expor a cavidade abdominal até o diafragma. O fígado foi retirado e colocado em solução de tampão fosfato de sódio (PBS, 10 mmol/L; pH 7,4), sob banho de gelo. Depois de lavados, repetidas vezes com solução PBS gelada, os fígados foram guardados em *freezer* a -80°C .

Para realizar a extração do conjunto microssomal (PHILLIPS e SHEPHARD, 1998; PRASAD e SINGH, 2009), pesou-se os fígados congelados e estes foram transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL), no qual foi adicionada solução de tampão fosfato de sódio (10 mmol/L; pH 6,8) com 250 mmol/L de sacarose e 13,4 mmol/L de PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil), sendo 5 mL desta solução para cada 1 g de fígado. Posteriormente, procedeu-se a trituração e homogeneização dos fígados com homogenizador Turrax (3 ciclos de 5 s a 20000 rpm). Em seguida, o homogenato foi submetido a uma seqüência de centrifugações diferenciais (4°C) para a remoção dos fragmentos celulares, mitocondriais, nucleares e a obtenção dos microssomas. Então, primeiramente, o homogenato foi centrifugado a uma velocidade de 500 rpm durante 5 min, o sobrenadante recolhido e centrifugado novamente a 5400 rpm por 10 min. Depois, procedendo da mesma forma realizou-se uma centrifugação a 10000 rpm por 20 min, e por fim, realizou-se uma ultracentrifugação a 45000 rpm durante 60 min. Nesta última etapa, o sobrenadante foi descartado e os “*pellets*” (sedimentos) obtidos foram dissolvidos no tampão fosfato de sódio (10 mmol/L; pH 6,8) com 250 mmol/L de sacarose e 13,4 mmol/L de PMSF, e transferidos para tubos criogênicos e armazenados em *freezer* a -80°C . A concentração protéica das frações conseguidas foi calculada baseando-se no método de Bradford (BRADFORD, 1976; LIMA *et al.*, 2006).

Todas as etapas de manuseio dos fígados foram sempre realizadas em banho de gelo, para que a atividade enzimática não fosse prejudicada, visto que as frações microssomais também eram destinadas a projetos de estudo de metabolismo de fármacos.

3.4.3 – Frações Microssomais: determinação da concentração protéica

3.4.3.1 – Preparo das soluções de BSA

Uma solução padrão de albumina sérica bovina foi preparada em água na concentração de 1,0 mg/mL, tendo sua absorvância ajustada para 0,66 no comprimento de onda (λ) de 280 nm.

A partir dessa solução estoque, seis soluções padrão de BSA foram preparadas nas concentrações de 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000 μ g/mL através de alíquotas de 10 – 100 μ L da solução estoque, transferidas em tubos de ensaio e diluídas com água para um volume final de 100 μ L.

Cada solução padrão foi preparada em triplicata ($n = 3$).

3.4.3.2 – Preparo do reagente de Bradford

Baseando-se no procedimento de Bradford (BRADFORD, 1976), foi pesado 25,0 mg do corante azul brilhante “Comassie *Brilhante Blue*” e dissolvido em 12,5 mL de etanol. Posteriormente, 25 mL de ácido fosfórico (85 % P.A.) foram adicionados, sob constante agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água. A solução do reagente apresentava concentração final de corante de 100 mg/mL e foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

3.4.3.3 – Determinação da concentração protéica das frações microssomais

Em cada tubo de ensaio, contendo 100 μ L da solução padrão preparada de BSA, adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de Bradford. Realizou-se agitação com auxílio de vórtex por 5 s e a mistura final foi deixada em repouso por 7 min para a ocorrência da reação. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se a absorvância em $\lambda = 596$ nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína–corante. As leituras espectrofotométricas foram medidas contra um branco de corante.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras em triplicata, bem como para a fração microssomal obtida.

3.4.4 – Empacotamento da coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5 μm e 100 \AA)

A coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5 μm , 100 \AA) empacotada no laboratório encontrava-se disponível no grupo. Seu procedimento de empacotamento e avaliação segue descrito.

Foram pesadas 0,7 g da fase hidrofóbica octadecil-sílica Nucleosil (C18, 5 μm , 100 \AA), a qual foi suspensa em 30 mL de metanol e homogeneizada durante 3 minutos em ultra-som. A sílica foi empacotada em uma coluna de aço inoxidável (10,0 x 0,21 cm D.I.), à pressão de 7500 psi empregando-se metanol como solvente. Depois, a fase estacionária foi condicionada em metanol durante aproximadamente 12 horas a uma vazão de 0,2 mL/min.

A coluna preparada foi avaliada injetando-se 10 μL de uma solução contendo os padrões acetofenona (0,6 mg/L) e benzofenona (0,7 mg/L), diluídos em fase móvel. A fase móvel empregada para a análise cromatográfica foi MeOH/H₂O (70:30, v/v), a uma vazão de 0,2 mL/min e $\lambda = 254 \text{ nm}$.

3.4.5 – Otimização das condições LC-MS/MS para as colunas C18 Ascentis Express e Nucleosil

Para o ajuste dos parâmetros do MS, a inserção direta da solução do analito (500 ng/mL) foi realizada via bomba seringa (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) e a intensidade do sinal do íon molecular monitorado. A condição adequada foi determinada no máximo de aquisição do íon para a fonte de ionização empregada. Tanto o modo positivo quanto o negativo de aquisição foi avaliado. Alguns parâmetros foram ajustados manualmente (por exemplo, temperatura e vazão do gás secante), enquanto outros foram ajustados automaticamente (como potencial do skimmer ou capilar). Este procedimento foi feito para a fonte de ionização por ESI e APCI.

Para os parâmetros MS/MS foram feitos experimentos de SRM para a rifampicina via inserção direta (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) e as condições de fragmentação para os

mecanismos de ionização por ESI e APCI foram otimizadas por meio do monitoramento da transição m/z 823 \rightarrow 791 (PRASAD e SINGH, 2009).

Mediante as melhores condições otimizadas, quatro métodos LC-MS/MS foram estabelecidos:

- 1) Dois métodos para a coluna C18 Ascentis Express, um para uso da fonte de ionização por ESI e outro para APCI;
- 2) Da mesma forma, dois métodos para a coluna C18 Nucleosil, um para cada mecanismo de ionização.

3.4.5.1 – Condições LC-MS/MS para coluna C18 Ascentis Express

As condições otimizadas para a análise de rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Ascentis Express[®] Fused Core Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m) e fontes de ionização por ESI e APCI estão descritas nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente.

TABELA 3.1 – Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Ascentis Express® Fused Core Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm) e fonte de ionização por ESI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
Vazão	0,2 mL/min
Volume de Injeção	10 µL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	ESI
Vazão de entrada no MS	70 µL/min
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 4303 V
Temperatura do Gás Secante	365 °C
Gás Secante	8,0 L/min
Nebulizador	30 psi
<i>Target^a</i>	50000
<i>Max. Accu. Time^{b*}</i>	5 ms
Transição SEM	823 → 791
Amplitude de Fragmentação	0,20 V

^aQuantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*; ^bTempo máximo de acúmulo de íons.

TABELA 3.2 – Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Ascentis Express® Fused Core Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm) e fonte de ionização por APCI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
Vazão	0,2 mL/min
Volume de Injeção	10 µL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	APCI
Vazão de entrada no MS	70 µL/min
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 3516 V
Corona	+ 4000 nA
Temperatura do Gás Secante	325 °C
Temperatura do Gás Vaporizador	400 °C
Gás Secante	4,0 L/min
Nebulizador	25 psi
<i>Target</i> ^a	50000
<i>Max. Accu. Time</i> ^{b*}	5 ms
Transição SRM	823 → 791
Amplitude de Fragmentação	0,19 V

^aQuantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*; ^bTempo máximo de acúmulo de íons.

3.4.5.2 – Condições LC-MS/MS para coluna C18 Nucleosil

As condições otimizadas para a análise de rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 μm) e fontes de ionização por ESI e APCI estão descritas nas Tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente.

TABELA 3.3 – Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 μm) e fonte de ionização por ESI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O (80:20, v/v) com 0,02 % FA
Vazão	0,2 mL/min
Volume de Injeção	10 μL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	ESI
Vazão de entrada no MS	70 $\mu\text{L}/\text{min}$
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 4303 V
Temperatura do Gás Secante	365 °C
Gás Secante	8,0 L/min
Nebulizador	30 psi
<i>Target</i> ^a	50000
<i>Max. Accu. Time</i> ^{b*}	5 ms
Transição SRM	823 → 791
Amplitude de Fragmentação	0,22 V

^aQuantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*; ^bTempo máximo de acúmulo de íons.

TABELA 3.4 – Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS empregando-se a coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5,0 µm) e fonte de ionização por APCI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O (80:20, v/v) com 0,02 % FA
Vazão	0,2 mL/min
Volume de Injeção	10 µL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	APCI
Vazão de entrada no MS	70 µL/min
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 3516 V
Corona	+ 4000 nA
Temperatura do Gás Secante	325 °C
Temperatura do Gás Vaporizador	400 °C
Gás Secante	4,0 L/min
Nebulizador	25 psi
<i>Target^a</i>	50000
<i>Max. Accu. Time^{b*}</i>	5 ms
Transição SRM	823 → 791
Amplitude de Fragmentação	0,24 V

^aQuantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*; ^bTempo máximo de acúmulo de íons.

3.4.6 – Procedimentos de preparo de amostra *off-line*

3.4.6.1 – Extração em fase sólida (SPE)

Para a extração em fase sólida da rifampicina nas matrizes biológicas escolhidas foi empregado um procedimento experimental previamente desenvolvido no grupo (DENADAI *et al.*, 2009a).

O cartucho de SPE (HLB 1cc, 30 mg) foi ativado com 2 mL de MeOH, e condicionado com 1mL de água e 1mL do eletrólito acetato de amônio (10 mmol/L; pH 7,5). Na seqüência, aplicou-se 1 mL da amostra biológica, fortificada ou não com o analito. O cartucho foi lavado com 1 mL de água e 1 mL de MeOH: água (5:95 v/v). Depois, foram aplicados 2 mL de MeOH, ao quais foram recolhidos em tubo de

ensaio. O eluato foi evaporado no *Speed Vac Concentrator* (65 °C, 90 min de corrida dos quais 45 min de aquecimento) e reconstituído em 100 µL fase móvel.

Para realizar o estudo de efeito de matriz, amostras fortificadas com rifampicina antes e após o procedimento de extração foram preparadas, em replicatas (n = 5), conforme descrito:

Fortificação das Amostras com Analito Antes da Extração – a amostra aplicada nos cartuchos de SPE continha 10 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL), 100 µL do biofluido (plasma ou microssoma) e 890 µL de solução de acetato de amônio (10 mmol/L; pH 7,5).

Fortificação das Amostras com Analito Pós Extração – procedia-se a adição de 10 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL) após a etapa de evaporação da fração obtida da SPE, e também a adição de 90 µL de fase móvel.

Com relação aos fluidos biológicos, usou-se fração microssomal na concentração protéica de 10 mg/mL, sendo a diluição realizada com água a partir da solução estoque. O plasma humano foi usado na forma *in natura*.

Como amostra referência foi preparada uma solução de rifampicina (50 µg/mL) em fase móvel. Foram pipetados 10 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL) e 90 µL de fase móvel.

As amostras branco (n = 2) foram preparadas pela adição de 100 µL do biofluido e 900 µL de solução de acetato de amônio (10 mM; pH 7,5) e extraídas como descrito acima.

Ao final, todas as amostras obtidas (fortificadas antes e pós extração, amostra referência e amostra branco) foram analisadas por LC-MS/MS com emprego da coluna C18 Ascentis Express ou Nucleosil.

3.4.6.2 – Precipitação de proteínas (PP)

Inicialmente, 200 µL do fluido biológico foram transferidos para tubos de ensaio. Adicionou-se 400 µL de solvente orgânico (ACN ou MeOH) para promover a precipitação das proteínas. A mistura foi submetida à agitação por 10 s em um agitador do tipo vórtex e centrifugada a 5000 rpm, 4 °C, durante 10 min. Depois, o

sobrenadante foi recolhido, evaporado no Speed Vac Concentrator (65 °C, 50 min de corrida, dos quais 25 min de aquecimento) e reconstituído em 200 µL de fase móvel.

Alguns ajustes neste procedimento foram realizados dependendo se a matriz biológica era fortificada antes ou após a extração.

Fortificação das Amostras com Analito Antes da Extração – inicialmente, adicionou-se 20 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL) em 200 µL do biofluido, para então realizar a precipitação com o solvente orgânico. Depois, o experimento de extração seguiu conforme descrito anteriormente.

Fortificação das Amostras com Analito Pós Extração – procedeu-se a adição de 20 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL) e de 180 µL de fase móvel após a etapa de evaporação da amostra obtida de 3.4.6.2.

O procedimento de PP inicialmente apresentado descreve como foram obtidas as amostra branco, ou seja, biofluido submetido à precipitação sem a adição de rifampicina.

Para o estudo de ME, preparou-se a solução referência de rifampicina: 20 µL da solução estoque de rifampicina (500 µg/mL) e 180 µL de fase móvel.

Ao final, todas as amostras obtidas, preparadas em replicata (n = 5, para amostras branco n = 2), foram analisadas por LC-MS/MS com emprego da coluna C18 Ascentis Express ou Nucleosil.

3.4.7 – Avaliação do Efeito de Matriz: preparo de amostra *off-line*

3.4.7.1 – Estudo quantitativo

O efeito de matriz quantitativo foi realizado para a rifampicina nas matrizes biológicas plasma humano e frações microssomais, as quais foram submetidas a dois diferentes pré-tratamentos *off-line*: extração em fase sólida (SPE) e precipitação de proteínas (PP) com ACN ou MeOH.

Este procedimento experimental foi realizado em replicata (n = 5) para cada um dos biofluidos. Também foram injetadas amostras branco constituídas apenas da matriz sem a fortificação com o analito.

O efeito de matriz quantitativo foi determinado sempre com a injeção de 10 µL dos extratos provenientes dos diferentes preparos de amostra no sistema cromatográfico constituído pela coluna C18 Ascentis Express ou Nucleosil. Os parâmetros LC-MS/MS foram apresentados nas Tabelas 3.1 a 3.4.

3.4.7.2 – Estudo qualitativo

Para a determinação qualitativa do efeito de matriz realizou-se experimentos de infusão pós-coluna. Dessa forma, a intensidade da abundância dos íons de rifampicina (experimentos no modo SRM) foi constantemente monitorada.

Para a avaliação qualitativa do ME utilizando as formas de tratamento *off-line* (SPE e PP) selecionou-se a coluna C18 Ascentis Express como condição cromatográfica, e ambos os mecanismos de ionização (ESI e APCI) foram aplicados.

As condições cromatográficas empregadas foram:

- Coluna C18 Ascentis Express[®] *Fused Core* Supelco (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm, 90 Å);
- Fase Móvel: MeOH/H₂O (62:28, v/v) com 0,02 % FA;
- Vazão: 0,2 mL/min;
- Volume de injeção: 10 µL.

Foram injetadas as seguintes amostras (n = 2):

- Extrato da PP(ACN) do plasma humano;
- Extrato da PP(MeOH) do plasma humano;
- Extrato de PP(ACN) do microssoma;
- Extrato da PP(MeOH) do microssoma;
- Extrato da SPE de plasma humano
- Extrato da SPE de microssoma
- Água Milli-Q
- Fase móvel

Na bomba seringa foi inserida solução de rifampicina, 500 ng/mL (preparada em MeOH/H₂O; 1:1, v/v) a 10 µL/min.

3.4.8 – Preparo de amostra *on-line*

3.4.8.1 – Preparo da coluna RAM–C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å)

A coluna RAM–C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) encontrava-se disponível no grupo e seu procedimento de preparo e avaliação (LIMA *et al.*, 2006) segue descrito.

3.4.8.1.1 – Primeira etapa: empacotamento da coluna

Foram pesadas 1,5 g da fase estacionária C8-sílica Nucleosil (10 µm, 100 Å), esta foi suspensa em 50 mL de metanol, homogeneizada por 3 minutos em ultrassom. A sílica foi empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5,0 x 0,46 cm D.I.) sob pressão de 7500 psi, empregando-se metanol como solvente. Depois a coluna foi condicionada em metanol durante aproximadamente 5 horas, a uma vazão de 1,0 mL/min.

3.4.8.1.2 – Segunda etapa: Imobilização da proteína BSA

Após o empacotamento da coluna de fase hidrofóbica e condicionamento da mesma, esta foi eluída com solução tampão fosfato (KH₂PO₄ – 50 mmol/L; pH 6,00) durante 20 minutos a uma vazão de 1,0 mL/min. Na seqüência, um solução de albumina sérica bovina (BSA) (1,0 mg/mL) preparada em solução tampão KH₂PO₄ (50 mmol/L; pH 6,00) foi eluída durante 30 minutos, água por 20 minutos e duas porções de 10 mL de glutaraldeído a 25 % (v/v). Depois, a coluna foi deixada em repouso durante 12 horas.

Posteriormente, eluiu-se pela coluna uma solução de borohidreto de sódio (1,0 g/mL) até que o eluato apresentasse pH 10. Depois, a coluna foi deixada em repouso durante 2 horas, então, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 minutos e guardada em geladeira (4 °C).

3.4.8.2 – Avaliação da eficiência de exclusão protéica das colunas RAM-BSA

A avaliação da eficiência de exclusão protéica das colunas RAM-BSA foi conduzida segundo procedimento descrito por LIMA *et al.*, 2006.

3.4.8.2.1 – Etapa 1: Preparo do reagente de Bradford

No item 3.4.3.2 foi apresentado o procedimento de preparo do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4.8.2.2 – Etapa 2: Preparo das amostras

Inicialmente, a coluna RAM-BSA foi condicionada com água durante 30 min a 1,0 mL/min. Depois, procedeu-se a injeção de 50 μ L do fluido biológico e eluição com água. Coletaram-se, separadamente, duas frações de 5,0 mL do eluato em balões volumétricos durante os primeiros 10 min de corrida cromatográfica. Na seqüência, eluiu-se pela coluna a fase móvel ACN / H₂O / ISO (75:15:10, v/v/v) durante 5 min a 1,0 mL/min para a limpeza de compostos interferentes retidos na coluna, e então esta foi condicionada com água por 10 min para a próxima injeção.

As frações coletadas foram submetidas à reação com a solução de Bradford e analisadas.

Este procedimento foi repetido para os volumes de injeção de 100 e 200 μ L, em triplicata para cada volume.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200 μ L de fluido biológico em balão volumétrico de 5,0 mL e completando-se o volume com água. As soluções de referência não foram eluidas pelas colunas RAM-BSA e representam 100 % das proteínas presentes no biofluido.

Foram avaliados dois tipos de matrizes: plasma humano e frações microsossomais. O preparo de amostra consistiu em:

- Centrifugação a 10000 rpm por 10 min, a 4 °C para o plasma humano;
- Diluição da solução microsossomal para 10 mg/mL em água.

3.4.8.2.3 – Etapa 3: Análise das amostras – medidas espectrofotométricas

Pipetou-se 250 μL de cada uma das frações eluidas da coluna extratora, adicionou-se 5,0 mL da solução do corante azul brilhante e deixou-se reagir por 3 min sob agitação. Em seguida, uma alíquota foi transferida para uma cubeta de vidro e registrou-se a absorbância em $\lambda = 596 \text{ nm}$, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante. As leituras espectrofotométricas foram medidas contra um branco de água.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as frações coletadas bem como para as soluções de referência.

As eficiências de exclusão das proteínas pela coluna RAM-BSA foram calculadas confrontando as absorbâncias das amostras coletadas com as das soluções de referência (sem coluna), que fornecem a quantidade total de proteínas presente no plasma (100 %).

Na Figura 3.2, um esquema geral do procedimento experimental para a avaliação da eficiência de exclusão protéica é apresentado.

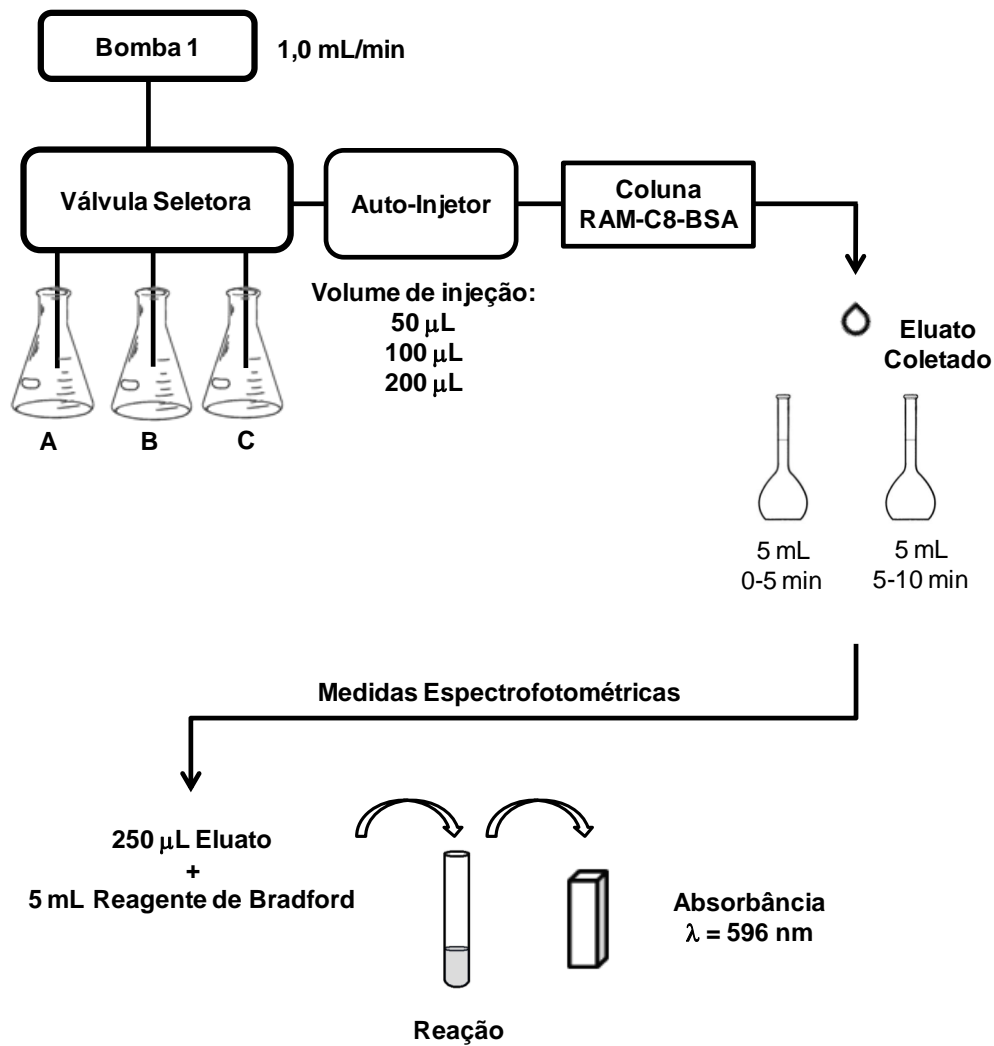


FIGURA 3.2 – Esquema do procedimento experimental empregado para a determinação da eficiência de exclusão protéica para colunas RAM-BSA (LIMA *et al.*, 2006).

3.4.8.3 – Coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.)

A coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) foi preparada de acordo com procedimento descrito por LIMA *et al.*, 2006. Empregou-se esta coluna durante a otimização do método de extração *on-line*, o que será melhor discutido na sub-seção 4.5.3.

Para o empacotamento do suporte hidrofóbico, foram pesados 0,3 g da fase octadecil-sílica Luna (C18, 10 µm e 100 Å), a qual foi suspensa em 30 mL de metanol, homogeneizada durante 3 minutos em ultra-som. A sílica foi empacotada em uma coluna de aço inoxidável (3,0 x 0,21 cm D.I.) sob pressão de 7500 psi, empregando-se metanol como solvente. Depois a coluna foi condicionada em metanol durante aproximadamente 5 horas, a uma vazão de 0,2 mL/min. Todo o

restante do procedimento de preparo da coluna RAM-C18-BSA foi procedido conforme já descrito no item 3.4.8.1.2.

Para a avaliação da eficiência de exclusão protéica da coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA) foi empregado o método de Bradford conforme relatado no item 3.4.8.2, porém com algumas adaptações:

- 1) Volume do eluato coletado foi de 2,0 mL;
- 2) Na reação os volumes foram modificados para 500 μL da solução eluída da coluna extratora e 3,00 mL da solução Comassie *Brilliant Blue*;
- 3) O branco adotado foi uma solução do corante, preparada adicionando-se 500 μL de água Milli-Q e 3,00 mL de solução Comassie *Brilliant Blue*.

3.4.8.4 – Procedimentos de preparo de amostra *on-line*

3.4.8.4.1 – Método unidimensional: Coluna RAM-C8-BSA

As condições cromatográficas otimizadas para o preparo de amostra *on-line* com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA) para a análise de rifampicina em matriz microssomal e em plasma humano estão descritas nas Tabelas 3.5 e 3.6, respectivamente. O volume de injeção empregado foi de 50 μL e a vazão de fase móvel 1,0 mL/min.

TABELA 3.5 – Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em frações microssomais com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA).

Tempo	Fase Móvel
0 – 5 min	H ₂ O com 0,05 % FA
5 – 16 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
16 – 21 min	ACN / H ₂ O / ISO (75:15:10, v/v/v)
21 – 31 min	H ₂ O com 0,05 % FA

TABELA 3.6 – Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em plasma humano com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å).

Tempo	Fase Móvel
0 – 5 min	H ₂ O
5 – 16 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
16 – 21 min	ACN / H ₂ O / ISO (75:15:10, v/v/v)
21 – 31 min	H ₂ O

Para a otimização da condição cromatográfica da segunda etapa levou-se em consideração os parâmetros determinados para a coluna C18 Ascentis Express (item 3.4.5.1).

3.4.8.4.2 – Método cromatográfico multidimensional: Coluna RAM-C8-BSA acoplada à coluna C18 Ascentis Express

Para o desenvolvimento do método multidimensional para a análise da rifampicina, composto pela coluna RAM-C8-BSA acoplada à C18 Ascentis Express, foram aplicadas as mesmas condições cromatográficas otimizadas para cada dimensão em separado, nas quais a fase móvel de transferência da coluna RAM é igual a fase móvel de análise na segunda dimensão. Apenas um ajuste precisou ser realizado, a adição de um divisor de vazão entre as colunas, de modo que 1/5 do eluente a 1,0 mL/min da coluna extratora fosse transferido para a coluna analítica (0,2 mL/min).

As condições cromatográficas otimizadas para o método multidimensional para a análise da rifampicina em matriz microssomal e em plasma humano estão descritas nas Tabelas 3.7 e 3.8, respectivamente.

TABELA 3.7 – Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em frações microsomais com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) acoplada à coluna C18 Ascentis Express.

	Tempo	Fase Móvel
1° Dimensão: Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 5,0 µm)	0 – 5 min	H ₂ O com 0,05 % FA
	5 – 16 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
	16 – 21 min	ACN / H ₂ O / ISO (75:15:10, v/v/v)
	21 – 31 min	H ₂ O com 0,05 % FA
2° Dimensão: Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21cm D.I.; 2,7 µm)	0 – 31 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA

TABELA 3.8 – Condições cromatográficas para a análise de rifampicina em plasma humano com emprego da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) acoplada à coluna C18 Ascentis Express.

	Etapa	Fase Móvel
1° Dimensão: Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 5,0 µm)	0 – 5 min	H ₂ O
	5 – 16 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
	16 – 21 min	ACN / H ₂ O / ISO (75:15:10, v/v/v)
	21 – 31 min	H ₂ O
2° Dimensão: Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21cm D.I.; 2,7 µm)	0 – 31 min	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA

3.4.8.5 – Condições LC-MS/MS para coluna RAM-C8-BSA na configuração simples e multidimensional

As condições do sistema LC-MS/MS para o método unidimensional e multidimensional estão descritas na Tabela 3.9.

TABELA 3.9 – Condições de análise da rifampicina por LC-MS/MS com emprego *on-line* da coluna RAM-C8-BSA no modo simples ou multidimensional de análise acoplada à coluna C18 Ascentis Express. Fonte de ionização por ESI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel de Análise	MeOH / H ₂ O (62:38, v/v) com 0,02 % FA
Vazão (RAM-C8-BSA)	1,0 mL/min
Vazão (C18 Ascentis Express) ^a	0,2 mL/min
Volume de Injeção	50 µL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	ESI
Vazão de entrada no MS	100 µL/min
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 4303 V
Temperatura do Gás Secante	365 °C
Gás Secante	8,0 L/min
Nebulizador	30 psi
<i>Target</i> ^b	50000
<i>Max. Accu. Time</i> ^c	50 ms
Transição SRM	823 → 791
Amplitude de Fragmentação	0,20 V

^aAplicado somente ao método multidimensional. ^bQuantidade de íons acumulados no *Ion Trap*; ^cTempo máximo de acúmulo de íons.

3.4.9 – Avaliação do Efeito de Matriz: preparo de amostra *on-line*

Os experimentos de quantificação do ME por LC-ESI-MS/MS foram realizados para os métodos de extração *on-line* uni (coluna RAM) e multidimensional (colunas RAM + Ascentis Express) para cada um dos biofluidos, plasma humano e frações microssomais, sendo o primeiro previamente centrifugado (10000 rpm, 10 min, 4 °C) e o segundo diluído com água para uma concentração protéica de 10 mg/mL. A fortificação da matriz consistia na adição de 20 µL da solução de rifampicina (5 µg/mL em MeOH) em 200 µL de fluido biológico, obtendo ao final uma concentração de analito na matriz de 500 ng/mL. Estas amostras foram preparadas em replicata (n = 5), bem como as soluções referência de rifampicina, constituídas de 20 µL da solução de rifampicina (5 µg/mL em MeOH) e 180 µL de fase móvel. As amostras branco foram feitas em duplicata e eram compostas apenas pelo biofluido sem adição do analito.

Para que ME fosse quantificado, eram injetados na coluna extratora 50 µL da amostra final obtida (plasma ou microssoma fortificado com rifampicina, solução referência e amostra branco).

3.4.10 – Tratamento de resíduos

Os resíduos de todos os solventes orgânicos utilizados durante o desenvolvimento deste projeto foram tratados de acordo com o protocolo da unidade de tratamento de resíduos químicos da Universidade Federal de São Carlos. Os resíduos biológicos foram inativados com hipoclorito de sódio e, posteriormente, encaminhados para a unidade de tratamento de resíduos químicos da Universidade Federal de São Carlos. Lixos biológicos, como ponteiros, luvas, inserts, tubos eppendorf (contaminados com plasma, microssomas, sangue, etc) foram retirados pela Prefeitura Universitária e devidamente incinerados juntamente com o lixo biológico da Universidade Federal de São Carlos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

*"Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você,
menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso.
Explore; viaje; descubra. Conheça".*

Albert Einstein

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

O uso de sistemas LC-MS/MS para a análise de substâncias em matrizes biológicas envolve a avaliação criteriosa do ME para que medidas confiáveis sejam obtidas, conferindo validade ao método desenvolvido. Isto porque o ME é originado pela competição entre espécies durante o processo de ionização, o que pode gerar resultados não reprodutíveis, comprometendo as análises quantitativas. Dessa forma, o efeito de matriz está intimamente ligado ao método de extração, pois em um eficiente tratamento de amostras, menor será o número de interferentes capazes de prejudicar/competir durante a ionização do composto alvo. Neste contexto, o presente projeto investigou diferentes pré-tratamentos tanto na configuração *off-line* (SPE e PP, com ACN ou MeOH como agentes precipitantes) quanto *on-line* (RAM no modo simples ou multidimensional de análise).

A escolha do mecanismo de ionização também constitui um fator importante para a minimização do ME, visto que este deve ser adequado às características físico-químicas do analito. Assim, duas distintas fontes de ionização a pressão atmosférica (ESI e APCI) foram comparadas quanto a sua relação com o ME para a análise de rifampicina nos fluidos biológicos selecionados.

4.1 – Matrizes Biológicas

Neste trabalho foram utilizados plasma humano e frações microssomais provenientes de ratos Wistar, pois estas são matrizes biológicas amplamente empregadas em testes farmacológicos, com protocolos já estabelecidos do setor terapêutico.

Durante o desenvolvimento do presente projeto foram realizadas três extrações microssomais através do método de centrifugação diferenciada, adaptado de PHILLIPS e SHEPHARD, 1998.

Na Figura 4.1 têm-se duas fotografias ilustrando as etapas de obtenção das frações microssomais dos fígados de ratos Wistar. Em A, é mostrado o homogenato inicial pronto para a primeira centrifugação e em B, a mistura final conseguida após a ultracentrifugação, na qual nota-se um sedimento depositado no fundo do tubo, que corresponde ao conjunto microssomal.

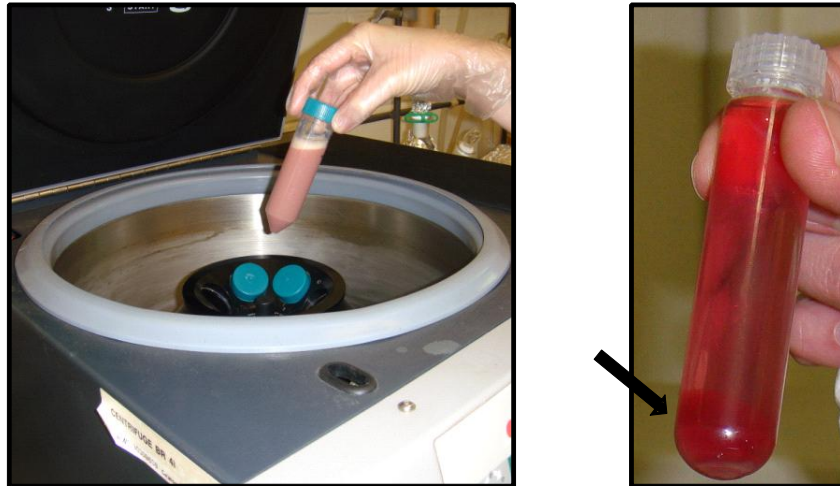


FIGURA 4.1 – Etapas da extração das frações microsossomais. A) O homogenato pronto para a primeira centrifugação; e B) a mistura resultante da ultracentrifugação.

Depois de obtidas as frações microsossomais extraídas dos fígados de ratos, a sua concentração protéica foi determinada, para que então, esta pudesse ser normalizada para todos os experimentos a serem realizados.

4.2 – Determinação da Concentração Protéica das Frações Microsossomais

A determinação da concentração protéica das frações microsossomais se faz necessária, visto que para a realização dos experimentos de efeito de matriz, as amostras de microsossomas devem ter sua concentração de proteínas padronizada (10 mg/mL), pois variações de composição da matriz levam a ME distintos, assim teríamos resultados não comparáveis.

A concentração protéica das frações microsossomais foi determinada por espectrofotometria no ultra-violeta visível com emprego do método de Bradford (BRADFORD, 1976; LIMA *et al.*, 2006). Para isso, uma curva de calibração foi construída a partir de soluções padrão de BSA em seis diferentes concentrações, sendo cada amostra preparada em replicata ($n = 3$). Seus valores de absorbância foram medidos em $\lambda = 280$ nm. A Figura 4.2 ilustra a curva de calibração para uma das extrações microsossomais realizadas e na Tabela 4.1 consta os valores das médias das absorbâncias, bem como a precisão e exatidão das medidas realizadas.

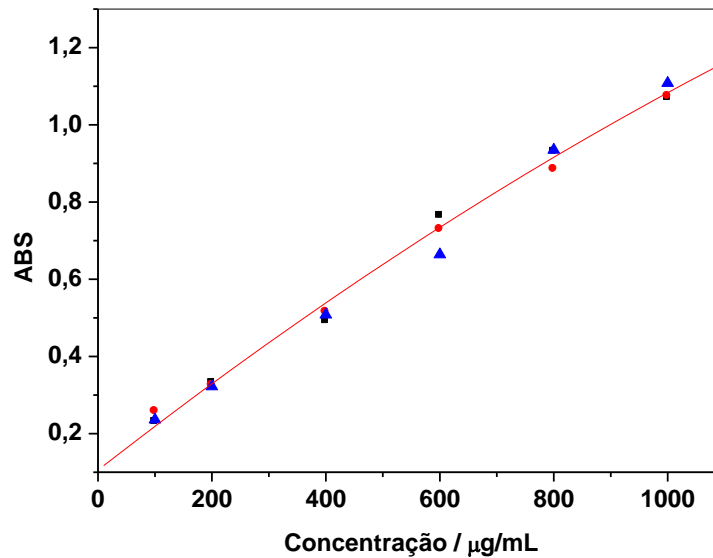


FIGURA 4.2 – Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA.

TABELA 4.1 – Valores da Média de ABS^a, Coeficiente de Variação (CV) e Exatidão para as amostras preparadas em diferentes concentrações de BSA^b para a determinação da concentração protéica da fração microssomal obtida.

Concentração (µg/mL)	Média ABS ^a	CV (%)	Exatidão (%)
100	0,2417	5,94	120,6
200	0,3263	1,57	99,0
400	0,5035	3,23	92,0
600	0,7193	7,12	97,8
800	0,9170	3,03	100,6
1000	1,0840	1,93	100,6

^aAbsorbância; ^bAlbumina sérica bovina; para estas análises $\lambda = 280$ nm.

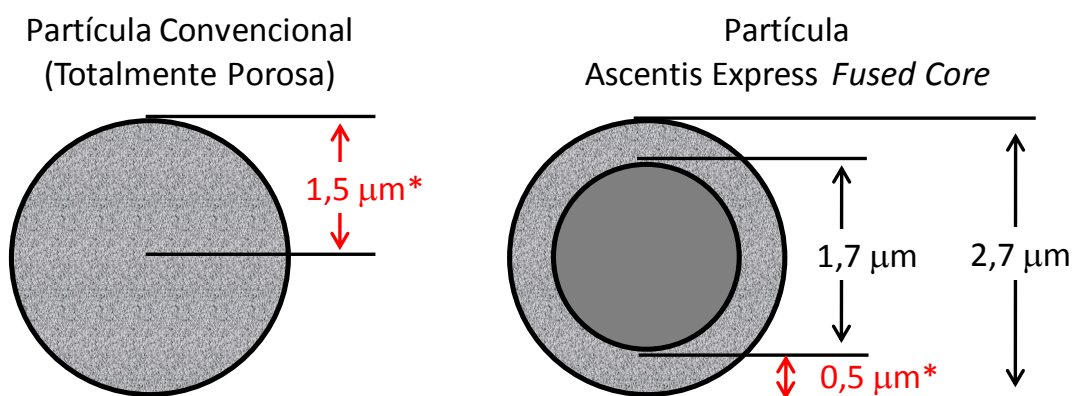
O valor de absorbância obtido para a amostra diluída de microssoma foi interpolado na curva de calibração e a concentração determinada, sendo esta de 34,59 mg/mL. Para as outras duas extrações microssomais realizadas procedeu-se da mesma forma, e os valores de concentração protéica para estas foram: 39,90 e 26,35 mg/mL. Estes valores estão de acordo com os valores reportados em diferentes trabalhos (PRASAD e SINGH, 2009; ROMÃO *et al.*, 2009), nos quais a concentração protéica varia de 20 a 40 mg/mL, o que demonstra que o procedimento experimental adotado foi eficiente para a extração desejada.

Segundo estudos farmacológicos empregando-se a matriz microssomal em ensaios *in vitro*, o valor de concentração protéica utilizado varia de 1,0 – 20,0 mg/mL (PRASAD e SINGH, 2009; ZHENG *et al.*, 2002), assim foi estipulado para todas as análises do presente trabalho o uso de soluções de microssomas com concentração de 10,0 mg/mL de proteínas, sendo esta uma condição intermediária.

4.3 – Análise da Rifampicina por LC-MS/MS

Para que a investigação do efeito de matriz pudesse ser realizada, as condições cromatográficas e de análise por MS foram inicialmente otimizadas. Mais especificamente, com relação aos parâmetros de LC, testaram-se diferentes fases móveis compostas por metanol, acetonitrila e água, em diferentes proporções, e também com a adição de aditivos, como o ácido fórmico (0,02 – 0,1 %) e o ácido acético (0,1 %). Duas colunas analíticas Ascentis Express[®] Fused Core Supelco com fases estacionárias C18 e Amida foram avaliadas, sendo ambas de dimensão (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm). O melhor perfil cromatográfico para a análise de rifampicina foi obtido com o emprego da coluna com fase estacionária C18. Dessa maneira, estabelecida a fase estacionária a ser utilizada, foi também empacotada uma coluna com sílica C18 Nucleosil, nas mesmas dimensões (10,0 x 0,21 cm D.I.), ou seja, com fase estacionária que propiciasse o mesmo tipo de interação cromatográfica que a da coluna Ascentis Express selecionada, porém com partícula totalmente porosa e com tamanho convencional (5 µm, 100 Å).

A coluna Ascentis Express é preparada com partículas desenvolvidas com tecnologia *Fused Core*, que consiste em uma partícula com o interior sólido, conforme ilustrado na Figura 4.3. A grande vantagem destas partículas é o menor caminho de difusão a ser percorrido pelo analito, o que resulta em separações cromatográficas mais rápidas, com melhor resolução e, conseqüentemente, com melhor eficiência cromatográfica. Adicionalmente, essas colunas apresentam pressões de trabalho menores do que colunas cromatográficas com partículas pequenas, mas totalmente porosas, como as partículas de 1,7 µm usadas em colunas de UPLC. Ainda essas colunas podem ser usadas com pequenas vazões de fases móveis (0,2 a 0,5 mL/min), o que favorece a evaporação do solvente pelas fontes de ionização.



*Caminho de Difusão

FIGURA 4.3 – Esquema representativo das fases estacionárias: convencionais e com a tecnologia *Fused Core*.

A comparação de efeitos de matriz entre colunas cromatográficas preparadas com sílicas do tipo *Fused Core* e com sílicas totalmente porosas é um parâmetro importante a ser investigado e, desta forma, foi um fator avaliado neste trabalho.

Para o ajuste dos parâmetros de análise da RIF em matrizes complexas por MS/MS experimentos de SRM foram realizados empregando-se as fontes de ionização por ESI e APCI. A espectrometria de massas *Tandem* é uma ferramenta indispensável, pelo fato de tornar a detecção ainda mais seletiva e específica para o íon de interesse (HOFFMANN, 1996). Como pode ser notado no espectro de MS apresentado na Figura 4.4, a transição SRM selecionada para a análise da rifampicina corresponde à fragmentação do íon molecular (m/z 823) gerando o íon fragmento m/z 791. Através do mecanismo de fragmentação mostrado na Figura 4.5, pode-se constatar que ocorre a perda de uma molécula de metanol, o que é comum e razoável em fragmentações de MS, e o íon produto é um carbocátion estável, pois a carga positiva é estabilizada por ressonância.

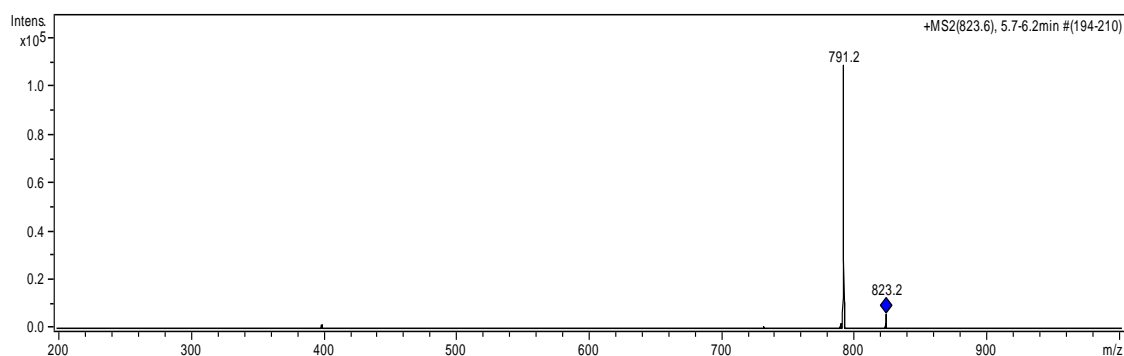


FIGURA 4.4 – Espectro de SRM da rifampicina (m/z 823 \rightarrow 791).

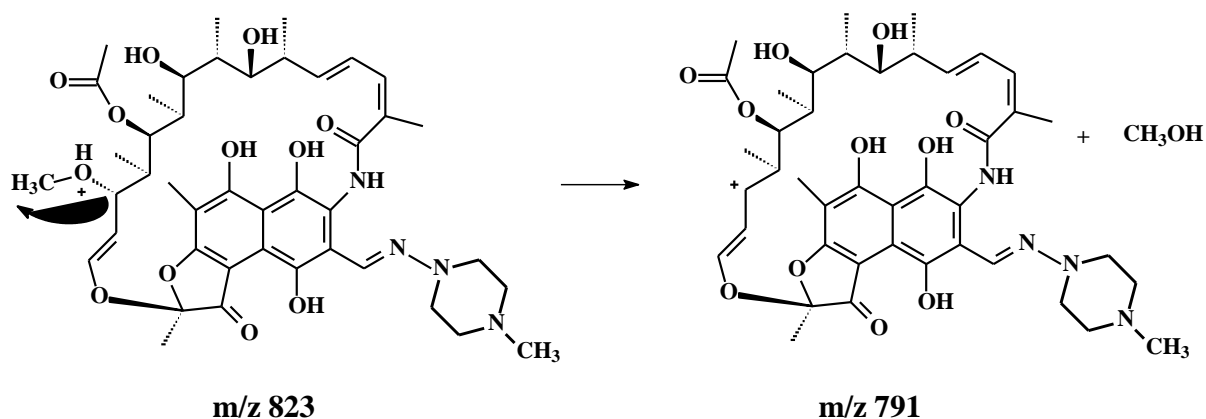


FIGURA 4.5 – Proposta de fragmentação da rifampicina.

Os parâmetros LC-MS/MS ajustados encontram-se descritos nas Tabelas 3.1 e 3.2 para a coluna Ascentis Express e Tabelas 3.3 e 3.4 para a coluna C18 Nucleosil *homemade*.

Os cromatogramas relativos à transição SRM $m/z\ 823 \rightarrow 791$ obtidos quando 10 μL de rifampicina (50 $\mu\text{g/mL}$) em fase móvel foram injetados nos sistemas LC-MS/MS são apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7.

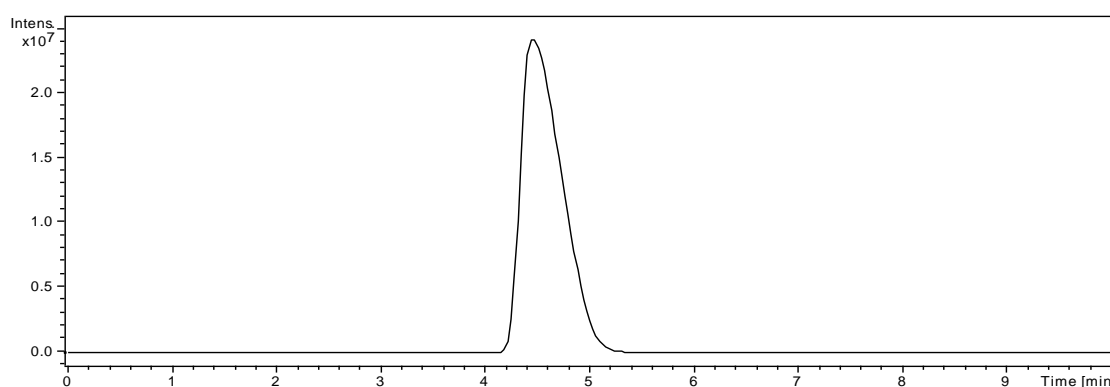


FIGURA 4.6 – Cromatograma relativo à transição SRM $m/z\ 823 \rightarrow 791$ para a análise de rifampicina na coluna C18 Ascentis Express. Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de vazão para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 μL ; Ionização por ESI (+); e Amplitude de fragmentação de 0,20.

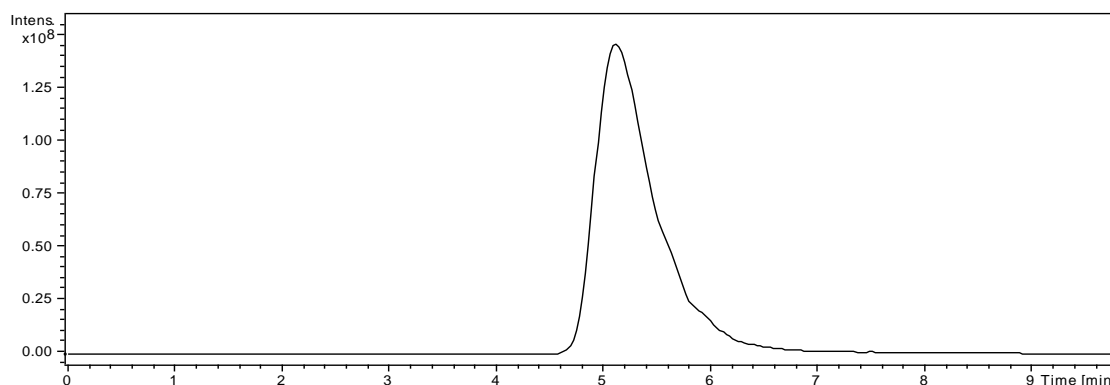


FIGURA 4.7 – Cromatograma relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Nucleosil. Fase móvel: MeOH/H₂O (80:20, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de vazão para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 μ L; Ionização por ESI (+); e Amplitude de fragmentação de 0,22.

Como pode-se observar, em ambos os métodos cromatográficos as fases móveis foram ajustadas com os mesmos solventes e proporção de ácido fórmico, de modo a obter composições cromatográficas próximas para análise de rifampicina em ambas as colunas avaliadas, uma vez que diferenças de efeito de matriz podem ser justificadas por meios químicos de ionização distintos.

As bandas cromatográficas obtidas da análise da rifampicina nas duas diferentes colunas foram similares entre si, com um pequeno alargamento da mesma na coluna C18 Nucleosil.

Com as condições de análise de rifampicina por LC-MS/MS definidas, os experimentos de investigação do efeito de matriz foram conduzidos. Os resultados obtidos foram divididos em dois grupos: **1)** quando a matriz biológica é submetida a um pré-tratamento *off-line*, e **2)** quando a matriz biológica é submetida a um pré-tratamento *on-line*.

4.4 – Efeito de Matriz: Pré-tratamento *Off-line* de Amostras

4.4.1 – Determinação quantitativa do Efeito de Matriz

O estudo quantitativo de efeito de matriz é a determinação numérica da porcentagem de supressão ou aumento da ionização de um determinado composto. Para isso são injetados no sistema LC-MS/MS: 1) extrato do preparo de amostra fortificado com solução do analito depois do procedimento de extração e 2) solução

de rifampicina em fase móvel. A banda cromatográfica resultante da injeção do analito em fase móvel é considerada como o valor referência, pois é considerada uma amostra livre de interferentes. Através de relações matemáticas entre as áreas dos cromatogramas de corrente iônica relativos à transição SRM para a análise de rifampicina é possível determinar o valor do efeito de matriz (ME). Quando no sistema LC-MS/MS é realizado a injeção do extrato fortificado com rifampicina antes do pré-tratamento da matriz biológica, pode-se obter também os valores de recuperação (RE) e eficiência de processo (PE, do inglês *Process Efficiency*) (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003). Os experimentos de quantificação do ME foram executados em replicatas (n = 5) e amostras branco (extratos sem dopagem) também foram analisadas. Os dados obtidos foram tratados como mostrado a seguir.

Primeiramente, definiu-se:

- Solução Padrão (rifampicina em fase móvel) – Área **A**
- Extrato do biofluido dopado **DEPOIS** da extração – Área **B**
- Extrato do biofluido dopado **ANTES** da extração – Área **C**

Através das relações matemáticas entre os valores dessas áreas cromatográficas:

Efeito de Matriz (ME) %

$$ME = (B / A) \times 100$$

Recuperação (RE) %

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

Eficiência do Processo (PE) %

$$PE = (C / A) \times 100 = (ME \times RE) / 100$$

Os termos “eficiência de processo”, “eficiência de extração” e “supressão de ionização” foram originalmente introduzidos por BUHRMAN *et al.*, 1996. Neste estudo, o efeito supressor de ionização era definido como $100 - [(B/A) \times 100]$ e a possibilidade de aumento de ionização ainda não era considerada. No trabalho de MATUSZEWSKI *et al.*, 2003, o efeito de matriz foi determinado através da relação

$(B/A) \times 100$. Desta forma, tanto a supressão quanto o aumento de ionização são considerados. Assim, valores de ME iguais a 100 % significam que não há efeito de matriz ($B = A$); valores de ME maiores que 100 % indicam que ocorreu um efeito de aumento de ionização ($B > A$) e ME menores que 100 % apontam que a matriz foi responsável pela supressão da ionização do analito ($B < A$). A porcentagem de influência da matriz na eficiência de ionização é dada pela diferença entre o valor de ME obtido e 100 %, que é o caso no qual nenhum efeito foi demonstrado, ou seja, para ME = 125 %, a matriz causou um efeito de aumento de sinal de 25 %, enquanto para ME = 90 %, 10 % de supressão foi obtida. Assim, nos experimentos realizados neste trabalho, essa mesma abordagem foi considerada e os valores de ME obtidos foram apresentados como positivo (+), para situações de aumento de ionização, e negativo (-) para os casos nos quais ocorreu supressão de ionização.

Adicionalmente, foram também realizadas análises de amostras branco, que são os extratos obtidos pelo tratamento dos fluidos biológicos sem fortificação com rifampicina. Esse procedimento é muito importante, uma vez que o mesmo permite verificar se há algum interferente proveniente da matriz que não foi eliminado durante o procedimento de tratamento da amostra que apresente a mesma transição SRM selecionada para a análise da RIF (m/z 823 \rightarrow 791).

Para os pré-tratamentos de amostra *off-line* foram selecionados dois procedimentos convencionais e rotineiramente utilizados nos métodos quantitativos de determinação de fármacos em fluidos biológicos: a SPE e PP, este último avaliado com dois diferentes agentes precipitantes (ACN e MeOH).

A avaliação sistemática foi conduzida através da injeção de 10 μ L do extrato no sistema LC-MS/MS. A coluna empregada foi a C18 Ascentis Express ou C18 Nucleosil e a fonte de ionização foi ESI ou APCI. Na Figura 4.8 é mostrado um fluxograma ilustrando todos os experimentos realizados. Vale ressaltar que várias comparações podem ser feitas para este conjunto de experimentos, seja devido à natureza da matriz biológica, o tipo de tratamento da amostra empregado, o mecanismo de ionização ou eficiência cromatográfica.

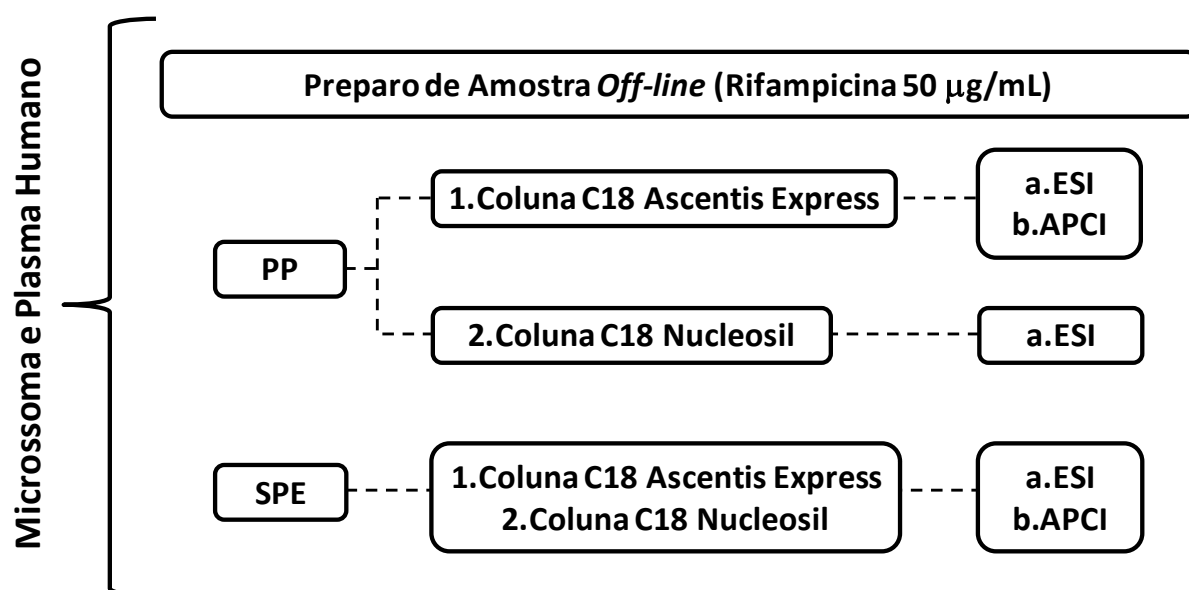


FIGURA 4.8 – Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz com preparo de amostras *off-line*.

Para os procedimentos de preparo de amostra *off-line* a concentração de rifampicina utilizada foi de 50 µg/mL de analito, visto que os estudos farmacocinéticos, assim como a posologia clínica, utilizam em pacientes adultos em tratamento da tuberculose uma dosagem diária de 600 mg, via administração intravenosa, o que ocasiona uma concentração máxima (C_{max}) plasmática de aproximadamente 40 – 50 µg/mL da rifampicina (LOOS *et al.*, 1985).

Os experimentos de fortificação da matriz antes e após o procedimento de extração foram realizados em replicata ($n = 5$) para todas as amostras preparadas. Os valores calculados de efeito matriz para a análise de RIF encontram-se descritos na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Valores obtidos de ME^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais: coluna comercial C18 Ascentis Express vs. coluna C18 Nucleosil *homemade*. Preparos de amostra *off-line* e ionização por ESI (+).

Tratamento das amostras	Efeitos de Matriz (%)			
	C18 Ascentis Express		C18 Nucleosil	
	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b
PP (ACN)	(+) 4,4	(+) 23,0	(+) 28,0	(-) 14,4
PP (MeOH)	(-) 7,0	(-) 4,0	(+) 28,0	(-) 28,5
SPE	(-) 2,4	(+) 22,1	(-) 24,2	(-) 8,3

^aEfeito de Matriz; ^bn = 5. (+): aumento da ionização; (-) supressão da ionização.

Avaliando os dados apresentados na Tabela 4.2, pode-se inferir que de um modo geral, o ME foi menos pronunciado quando foi empregado a coluna C18 Ascentis Express, salvo os casos de PP(ACN) e SPE para o plasma humano. Considerando que as amostras analisadas com as duas diferentes colunas foram identicamente preparadas, os diferentes resultados encontrados para um mesmo tratamento de amostra podem estar relacionados à diferença de eficiência cromatográfica entre as duas fases estacionárias, pois para a coluna Ascentis Express pode-se esperar uma melhor eficiência cromatográfica devido à sua partícula diferenciada. Para a avaliação de ME uma separação mais eficiente significa uma melhor discriminação entre o analito e os interferentes endógenos provenientes da matriz, o que implica em uma menor probabilidade de compostos coeluirem e competirem durante o processo de ionização, ou seja, um menor ME.

Para cada condição cromatográfica em separado, foi possível notar uma homogeneidade de valores de ME para o extração por PP(MeOH) independente da natureza da matriz tratada.

Para as análises realizadas com a coluna C18 Ascentis Express, menores valores de ME foram encontrados para a determinação de RIF em matriz microssomal do que em plasma humano, o que pode estar associado à diferença de concentração protéica, visto que nestes estudos foram utilizadas frações microssomais diluídas para 10 mg/mL, enquanto a matriz plasma humano era empregada sem diluição. Em trabalhos realizados em nosso laboratório, a concentração protéica do plasma humano foi determinada por espectrofotometria no

ultra-violeta visível com emprego do método de Bradford (BRADFORD, 1976; LIMA *et al.*, 2006). O valor obtido foi de 66,7 mg/mL (DENADAI, 2009b). Como em protocolos estabelecidos para análise de fármacos em plasma humano este biofluido não é diluído, optou-se por utilizar esta matriz na forma *in natura*.

Já para a coluna C18 Nucleosil foi observado um perfil diferente de ME. Pode-se observar que para as amostras de frações microssomais os valores de ME foram maiores que para o plasma humano, o que demonstra que, neste caso, a diferença entre as concentrações protéicas das amostras analisadas não mostrou ser um problema. No entanto, a natureza dos interferentes da matriz microssomal pareceu ser mais relevante para as análises realizadas com esta coluna cromatográfica.

Para os pré-tratamentos utilizados para a análise da rifampicina em fluido biológico com a coluna C18 Ascentis Express, tem-se que a SPE foi mais eficaz no procedimento de limpeza da fração microssomal, enquanto que PP(MeOH) apresentou melhores resultados para a redução do ME quando plasma humano foi utilizado. O resultado obtido com PP(MeOH) para plasma humano foi inesperado, pois é sabido que a SPE promove a limpeza de matrizes complexas com maior eficiência do que PP. Desta forma, pode-se novamente considerar a natureza dos interferentes presentes no extrato obtido após extração por PP, os quais afetaram menos o processo de ionização, associados a uma possível separação cromatográfica promovida pela coluna analítica. O mesmo raciocínio pode ser empregado quando a coluna C18 Nucleosil foi utilizada para as análises de rifampicina em plasma humano após PP(ACN) e SPE.

Neste conjunto de experimentos de fortificação do fluido biológico com RIF antes e após o procedimento de extração, pode-se obter também valores de recuperação (RE) e eficiência de processo (PE). Na Tabela 4.3 estes resultados são mostrados.

TABELA 4.3 – Valores obtidos de RE^a e PE^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microsossomais. Coluna comercial C18 Ascentis Express vs. coluna C18 Nucleosil *homemade*. Preparos de amostra *off-line* e ionização por ESI (+).

Preparo de Amostra	RECUPERAÇÃO (%)							
	C18 Ascentis Express				C18 Nucleosil			
	Microsossoma ^c		Plasma Humano ^c		Microsossoma ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)
PP(ACN)	102,1	6,1	83,3	13,3	81,2	2,1	64,3	13,2
PP(MeOH)	98,9	5,0	128,2	20,6	73,9	4,1	64,1	14,8
SPE	123,6	11,1	88,2	14,7	85,0	4,9	91,1	4,5

Preparo de Amostra	EFICIÊNCIA DE PROCESSO (%)							
	C18 Ascentis Express				C18 Nucleosil			
	Microsossoma ^c		Plasma Humano ^c		Microsossoma ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)
PP(ACN)	106,6	5,6	102,5	13,9	104,0	2,2	55,0	13,3
PP(MeOH)	92,0	6,8	123,1	22,3	94,5	3,6	45,8	9,0
SPE	120,7	7,5	107,7	13,8	64,4	4,8	83,6	3,6

^aRecuperação; ^bEficiência de processo; ^cn = 5; e ^dCoeficiente de Variação.

Para as medidas de RE têm-se que para a matriz microssomal os três métodos de extração avaliados mostraram-se eficientes para o enriquecimento da rifampicina, com RE de 73,9 a 123,6 %, e reprodutíveis, com valores de coeficiente de variação de 2,1 a 11,1 %. No geral, para a matriz microssomal foram obtidos melhores valores de RE e de precisão das medidas do que para o plasma humano, em ambas as colunas avaliadas.

Para o plasma humano, os valores de RE encontrados se situam no intervalo de 64,1 a 128,2 % e a precisão das medidas apresentou maiores variações, sendo os CV de 4,5 a 20,6 %.

Ademais, pode-se perceber que valores acima de 100 % de RE foram encontrados neste conjunto de experimentos e isso pode ser um indicativo da presença do efeito de matriz. A RE é uma relação matemática entre as áreas das bandas cromatográficas obtidas nos experimentos de SRM para as amostras fortificadas antes e após o procedimento de pré-tratamento e, em ambos os casos, o ME está presente. Assim, em teoria, através da relação entre estas áreas o ME seria desconsiderado. Porém, valores de RE maiores que 100 % foram verificados e isso pode ser explicado por um ME desigual para quando a matriz biológica é fortificada com o analito antes ou depois do processo de extração. O interessante nestes resultados é que para essas amostras (RE > 100 %), os valores de ME foram obtidos na ordem de 2,0 a 4,0 %, ou seja, valores numericamente baixos, mas significativos, comprometendo a recuperação e a eficiência de processo no que diz respeito à precisão intradia dos ensaios.

Outro indício da existência de ME para estes resultados é a diferença encontrada dos valores de RE, e de seus respectivos CV, para as distintas condições cromatográficas avaliadas. Como, teoricamente, a medida de RE está apenas associada ao método de extração, ou seja, não depende das condições cromatográficas, nem dos parâmetros MS, era de se esperar que valores próximos de eficiência de extração fossem encontrados quando as colunas Ascentis Express e Nucleosil fossem empregadas e, como é possível notar pela Tabela 4.3, esse perfil não ocorreu na maioria dos casos.

A PE engloba todas as variáveis envolvidas no procedimento experimental, sendo estas: natureza do biofluido, perdas durante o preparo das amostras, o efeito de matriz, erros sistemáticos ocasionados pelo analista, bem como variações relacionadas à sensibilidade dos equipamentos utilizados. Dessa forma, os valores

obtidos de PE podem ser explicados pelas discussões já realizadas para os resultados de recuperação e de efeito de matriz.

Com relação à precisão intradia, calculada a partir das análises das amostras utilizadas nos experimentos de quantificação do ME, RE e PE, nas Tabelas 4.4 e 4.5 são apresentados os valores dos coeficientes de variação (CV %) obtidos quando PP e SPE foram utilizados, respectivamente.

Para a maioria dos resultados foram observados CV menores que 15 %, dessa forma, apresentam precisão dentro da faixa aceitável para a determinação de fármacos em matrizes biológicas (ANVISA, resolução 899/03; CASSIANO, *et al.* 2009b). A única exceção foi o valor de 19,93 % referente à PP(MeOH) com adição de RIF antes da extração empregando-se a coluna C18 Ascentis Express, discutido anteriormente.

Analisando os CV para precisão interdia da análise das soluções padrão de rifampicina, nota-se que estes se situam entre 1,25 % e 9,96 %. Assim, como a amostra padrão é uma solução de RIF em solvente e não é submetida a nenhum tratamento de amostra, é possível constatar que houve uma variação dos resultados obtidos entre diferentes dias, o que pode ser atribuído a erros sistemáticos de preparo das amostras ou de reprodutibilidade na resposta do espectrômetro de massas.

Essa observação é importante, pois o maior valor de CV para as amostras padrão de RIF foi obtido no mesmo dia em que uma maior variabilidade também foi observada para as medidas das amostras biológicas fortificadas com o analito.

TABELA 4.4 – Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por PP^a e ionização por ESI (+).

Amostras	C18 Ascentis Express				C18 Nucleosil			
	Microssomas ^g		Plasma Humano ^g		Microssomas ^g		Plasma Humano ^g	
	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)
PP(ACN) ^b Adição antes ^c	14.990.665	1,89	18.836.833	9,76	5.364.081.981	1,07	7.104.479.999	13,07
PP(ACN) ^b Adição pós ^d	14.676.494	5,79	22.612.181	8,99	6.608.647.134	1,80	11.052.999.576	1,97
PP(MeOH) ^e Adição antes ^c	12.932.870	4,10	22.620.902	19,93	4.880.461.754	3,00	5.911.469.438	8,76
PP(MeOH) ^f Adição pós ^d	13.081.110	2,81	17.643.263	5,28	6.608.122.830	2,82	9.227.209.692	11,99
Padrão ^f	14.059.219	5,44	18.378.190	9,96	5.161.795.076	1,97	12.910.089.510	2,26

^aPrecipitação de proteínas; ^bPrecipitação de proteínas com ACN como agente precipitante; ^cAdição da rifampicina feita antes ou ^dpós extração; ^ePrecipitação de proteínas com MeOH como agente precipitante; ^fSolução de rifampicina em fase móvel; ^gn = 5; ^hMédia das áreas.

TABELA 4.5 – Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e na matriz biológica. Pré-tratamento por SPE^a e ionização por ESI (+).

Amostras	C18 Ascentis Express				C18 Nucleosil			
	Microssomas ^e		Plasma Humano ^e		Microssomas ^e		Plasma Humano ^e	
	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)
SPE ^a Adição Antes ^b	15.353.467	6,88	14.795.859	13,65	4.213.632.377	4,69	5.465.057.462	3,34
SPE ^a Adição Pós ^c	12.421.364	8,75	16.767.289	5,49	4.958.559.619	1,55	5.999.817.389	3,00
Padrão ^d	12.723.514	3,01	13.736.435	2,11	6.540.594.599	1,25	6.540.594.599	1,25

^aExtração em fase sólida; ^bAdição da rifampicina feita antes ou ^cpós extração; ^dSolução de rifampicina em fase móvel; ^en = 5; ^fMédia das áreas.

Dentre os parâmetros relacionados ao ME têm-se, além da eficiência de extração das amostras e da separação cromatográfica, o mecanismo de ionização empregado. Neste contexto, foram avaliadas as fontes de ionização por ESI e APCI para a análise da RIF em fluidos biológicos, com emprego da coluna C18 Ascentis Express.

4.4.2 – Diferentes fontes de ionização: ESI vs. APCI

Muitos trabalhos discutiram e comprovaram que o efeito de matriz é dependente do tipo de fonte de ionização. Em estudo realizado por MATUSZEWSKI *et al.* (2003) o ME foi quantificado confrontando-se diferentes fontes de ionização API, e foi demonstrado que o ME está diretamente relacionado ao mecanismo de ionização, uma vez que neste caso, melhores valores de ME foram obtidos para a ionização por APCI. O mesmo foi constatado por SOUVERAIN *et al.* (2004a) em seus estudos qualitativos de determinação do ME. Dessa forma, é notável a importância da seleção da fonte de ionização para a minimização do efeito de matriz, e assim, no presente projeto, diferentes mecanismos de ionização foram investigados (APCI e ESI) quanto a sua influência no processo de ionização da rifampicina. Na Figura 4.9 é mostrado um cromatograma SRM para a RIF quando analisada na coluna cromatográfica C18 Ascentis Express e submetida à ionização por APCI.

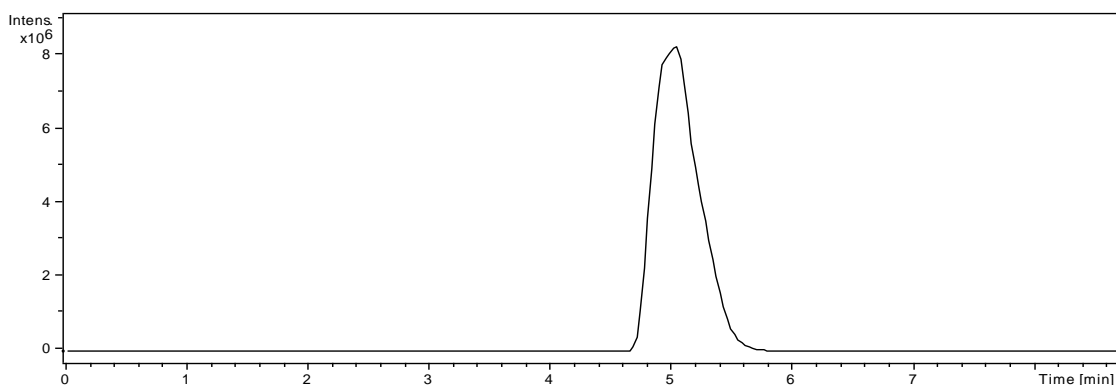


FIGURA 4.9 – Cromatograma relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Ascentis Express. Fase móvel: (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção: 10 μ L; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; e Amplitude de fragmentação: 0,19.

Na Tabela 4.6 foram colocados os valores de efeito de matriz e na Tabela 4.7 encontram-se os valores de RE e PE, para os procedimentos de LC-MS/MS com ionização por ESI e APCI.

TABELA 4.6 – Valores obtidos de ME^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microsossomais com emprego de ESI e APCI. Preparos de amostra *off-line* e coluna C18 Ascentis Express.

Tratamento das amostras	Efeitos de Matriz (%)			
	ESI		APCI	
	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b
PP (ACN)	(+) 4,4	(+) 23,0	(-) 15,8	(+) 34,9
PP (MeOH)	(-) 7,0	(-) 4,0	(-) 14,8	(+) 14,2
SPE	(-) 2,4	(+) 22,1	(-) 20,1	(-) 17,0

^aEfeito de Matriz; ^bn = 5. (+): aumento da ionização; (-) supressão da ionização.

TABELA 4.7 – Valores obtidos de RE^a e PE^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais com emprego de ESI e APCI. Preparo de amostra *off-line* e coluna C18 Ascentis Express.

Preparo de Amostra	RECUPERAÇÃO (%)							
	ESI				APCI			
	Microssoma ^c		Plasma Humano ^c		Microssoma ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)
PP(ACN)	102,1	6,1	83,3	13,3	88,9	6,8	99,9	16,1
PP(MeOH)	98,9	5,0	128,2	20,6	106,9	8,7	79,5	18,0
SPE	123,6	11,1	88,2	14,7	121,7	12,7	92,2	5,1

Preparo de Amostra	EFICIÊNCIA DE PROCESSO (%)							
	ESI				APCI			
	Microssoma ^c		Plasma Humano ^c		Microssoma ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)	Média	CV ^d (%)
PP(ACN)	106,6	5,6	102,5	13,9	74,8	7,0	134,7	14,7
PP(MeOH)	92,0	6,8	123,1	22,3	91,1	7,7	90,8	14,8
SPE	120,7	7,5	107,7	13,8	97,2	11,2	76,5	6,3

^aRecuperação; ^bEficiência de processo; ^c $n = 5$; e ^dCoeficiente de Variação.

É possível observar na Tabela 4.6 que ocorreu efeito de supressão ou de aumento de ionização em uma faixa de 2,4 % a 34,9 %, para as duas fontes de ionização investigadas, independente do pré-tratamento de amostra ou da matriz biológica.

Alguns estudos mostraram que a ionização por APCI foi menos susceptível ao efeito de matriz do que a ESI (DAMS e HUESTIS, 2003; KING *et al.*, 2000; SOUVERAIN *et al.*, 2004a). Porém, como pode ser observado pela Tabela 4.6, um perfil contrário foi notado para a análise da rifampicina nas frações microssomais e plasmáticas (exceto para a SPE do plasma humano). Estes resultados estão associados às características físico-químicas da molécula de RIF, que mostrou ser mais eficientemente ionizada pela fonte de ESI do que pela de APCI, o que implica em uma maior eficiência de ionização e resposta analítica, com conseqüente redução de ME.

Com relação às matrizes biológicas, maiores valores de efeito de matriz foram determinados para a análise de RIF em plasma humano, isso pode ser justificado pelo maior teor de proteínas desse biofluido frente às frações microssomais, visto que este último era diluído para 10 mg/mL de concentração protéica, enquanto o primeiro era utilizado na sua forma *in natura*.

Confrontando-se os diferentes métodos de preparo de amostra, constata-se que para a análise de rifampicina em frações microssomais, qualquer um dos três procedimentos de extração mostrou ser adequado, com valores de ME de 2,4 a 7,0 %, quando a fonte de ionização empregada foi a ESI. No entanto, para a análise de rifampicina em plasma humano, o tratamento de amostra mais eficiente na redução do ME foi a PP(MeOH). Para a ionização por APCI, notam-se valores de ME maiores do que àqueles obtidos por ESI, sendo este encontrado na faixa de 14,2 a 34,9 %, e para ambas as matrizes biológicas um menor ME foi observado quando a PP(MeOH) foi o pré-tratamento utilizado.

Para os valores de RE, quando as fontes ESI e APCI são comparadas, observa-se que foram obtidos valores de 83,3 a 123,6 % com emprego da fonte de ESI e de 88,9 a 121,7 % para a fonte de APCI.

Com relação os métodos de preparo de amostra aplicados ao tratamento de plasma humano, percebe-se que a PP(ACN) e PP(MeOH) foram os procedimentos que propiciaram os maiores CV para os valores de recuperação medidos. Para a

matriz microsomal, todos os procedimentos de extração foram adequados (com CV menores que 15 %).

Como anteriormente discutido, PE é reflexo tanto da RE quanto do ME. Desta forma, os valores de PE podem ser justificados ora por um ME pronunciado, como por exemplo, na PP(ACN) de plasma humano, com ionização por APCI, na qual PE = 134,7; ME = (+) 34,9; e RE = 99,9, ou outrora por valores de RE altos, como no caso da PP(MeOH) de plasma humano e ionização por ESI (PE = 123,1; ME = (-) 4,0; RE = 128,2).

Neste conjunto de experimentos, amostras branco de ambas as matrizes biológicas foram avaliadas, para todos os casos de preparo de amostra, tanto para a ionização por APCI quanto por ESI, e nenhum interferente foi detectado na transição SRM (m/z 823 → 791) selecionada.

Nas Tabelas 4.8 e 4.9 são apresentadas as precisões intradia das análises das amostras utilizadas nos experimentos de determinação quantitativa de ME, RE e PE, para ambas as fontes de ionização (ESI e APCI) e análise na coluna C18 Ascentis Express.

TABELA 4.8 – Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por PP^a, coluna C18 Ascentis Express e ionização por ESI e APCI.

Amostras	ESI				APCI			
	Microssomas ^g		Plasma Humano ^g		Microssomas ^g		Plasma Humano ^g	
	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)	Área ^h	Precisão (%)
PP(ACN) ^b Adição antes ^c	14.990.665	1,89	18.836.833	9,76	147.403.931	5,76	123.859.259	14,67
PP(ACN) ^b Adição pós ^d	14.676.494	5,79	22.612.181	8,99	165.762.769	3,67	124.029.513	6,75
PP(MeOH) ^e Adição antes ^c	12.932.870	4,10	22.620.902	19,93	179.498.046	6,57	83.478.035	14,81
PP(MeOH) ^e Adição pós ^d	13.081.110	2,81	17.643.263	5,28	167.882.556	5,78	104.965.720	10,31
Padrão ^f	14.059.219	5,44	18.378.190	9,96	196.948.808	3,92	91.918.534	0,87

^aPrecipitação de proteínas; ^bPrecipitação de proteínas com ACN como agente precipitante; ^cAdição da rifampicina feita antes ou ^dpós extração; ^ePrecipitação de proteínas com MeOH como agente precipitante; ^fSolução de rifampicina em fase móvel; ^gn = 5; ^hMédia das áreas.

TABELA 4.9 – Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e em matriz biológica. Pré-tratamento por SPE^a, coluna C18 Ascentis Express e ionização por ESI e APCI.

Amostras	ESI				APCI			
	Microsomas ^e		Plasma Humano ^e		Microsomas ^e		Plasma Humano ^e	
	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)
SPE ^a Adição Antes ^b	15.353.467	6,88	14.795.859	13,65	184.897.767	6,83	170.249.008	4,22
SPE ^a Adição Pós ^c	12.421.364	8,75	16.767.289	5,49	151.939.953	10,71	184.694.575	2,82
Padrão ^d	12.723.514	3,01	13.736.435	2,11	190.195.719	8,82	222.602.633	4,63

^aExtração em fase sólida; ^bAdição da rifampicina feita antes ou ^cpós extração; ^dSolução de rifampicina em fase móvel; ^en = 5; ^fMédia das áreas.

Avaliando-se os dados obtidos para as análises conduzidas com a coluna Ascentis Express e pré-tratamento das frações microssomais (Tabela 4.8), nota-se que menores valores de CV foram obtidos quando o mecanismo de ionização por ESI foi utilizado. Para a matriz plasmática o perfil inverso foi constatado, uma vez que os resultados correspondentes a ionização por APCI apresentaram uma maior precisão intradia.

Comparando-se os diferentes pré-tratamento de amostra procedidos para a análise da RIF empregando-se a coluna comercial, tem-se que para a PP maiores valores de CV foram obtidos quando comparados com SPE, alcançando valores de até 19,93 %, e também observa-se uma faixa de variabilidade maior (de 1,89 % a 19,93 % para a PP e 2,11 % a 13,65 % para a SPE). Esses resultados podem ser justificados pelo fato do procedimento de SPE ser mais preciso do que a PP.

Da mesma forma, foram realizados experimentos empregando-se a coluna C18 Nucleosil, confrontando-se as fontes de ionização por ESI e APCI. Para este estudo, apenas o procedimento de extração *off line* por SPE foi selecionado para ambas as matrizes em estudo.

Os cromatogramas de SRM da análise de RIF em solvente, e dos biofluidos fortificados com RIF pós-extração, com emprego da coluna cromatográfica C18 Nucleosil *homemade* e sistema MS com ionização por APCI são apresentados na Figura 4.10. Dessa forma, é possível visualizar a diferença entre as áreas dos cromatogramas de SRM na presença de interferentes da matriz e da solução referência. O ME foi quantificado e encontra-se na Tabela 4.10.

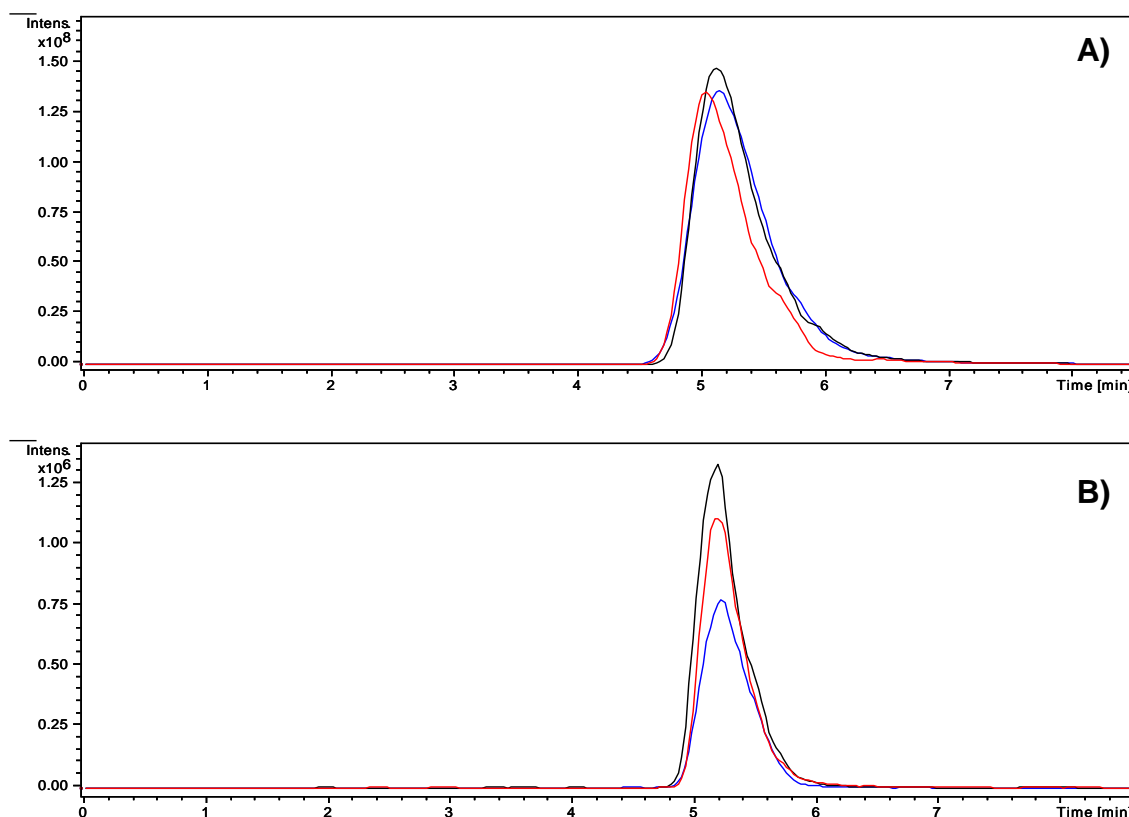


FIGURA 4.10 – Cromatogramas relativos à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina na coluna C18 Nucleosil. Fase móvel: MeOH/H₂O (80:20, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 0,2 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); volume de injeção de 10 μ L de (-----) rifampicina em fase móvel; e rifampicina adicionada pós extração de (-----) plasma humano e (-----) frações microssomais.

Em A) Ionização por ESI (+) e Amplitude de fragmentação de 0,22.

Em B) Ionização por APCI (+); Corona: + 4000 nA e Amplitude de fragmentação de 0,24.

TABELA 4.10 – Valores obtidos de ME^a para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando submetidos à extração por SPE. Coluna C18 Nucleosil e ionização por ESI e APCI.

	ESI		APCI	
	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b	Microssomas ^b	Plasma Humano ^b
ME (%)	(-) 24,2	(-) 8,3	(-) 19,1	(-) 42,0

^aEfeito de Matriz. ^b $n = 5$. (+): aumento da ionização; (-) supressão da ionização.

Como pode ser observado na Tabela 4.10, para a análise do extrato resultante do tratamento da matriz plasma humano, empregando-se a coluna C18 Nucleosil, a ionização por APCI mostrou-se ser mais sensível ao ME do que a

ionização por ESI, o que também foi a tendência apresentada na maioria das análises realizadas com a coluna C18 Ascentis Express. Este comportamento foi associado às características físico-químicas da RIF. Porém, quando a RIF fortificada em frações microssomais foi analisada na coluna Nucleosil, a relação inversa foi observada, ou seja, um ME mais pronunciado foi obtido com fonte ESI do que com APCI.

Os valores de RE e PE obtidos para a análise de RIF nos dois biofluidos, com emprego da coluna C18 Nucleosil e ionização por ESI e APCI constam na Tabela 4.11.

TABELA 4.11 – Valores obtidos de RE^a e PE^b para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando submetidos à extração por SPE. Coluna C18 Nucleosil *homemade* e ionização por ESI e APCI.

	ESI			
	Microssomas ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)
RE ^a (%)	85,0	4,9	91,1	4,5
PE ^b (%)	64,4	4,8	83,6	3,6

	APCI			
	Microssomas ^c		Plasma Humano ^c	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)
RE ^a (%)	71,3	11,7	113,6	25,4
PE ^b (%)	57,7	9,9	65,9	23,5

^aRecuperação; ^bEficiência de Processo; ^cn = 5.

Para as medidas de RE, os resultados obtidos para a análise de RIF em fração microssomal e plasma humano por ESI e de RIF em fração microssomal por APCI, apresentaram maior precisão (4,5 a 11,7 %) do que quando RIF foi extraída de plasma humano e a amostra analisada com fonte de APCI (CV = 25,4 %). Este resultado é apontado devido ao maior ME (Tabela 4.10). Para os valores de PE o mesmo perfil é observado.

Na Tabela 4.12 são apresentadas as precisões intradia das análises das amostras utilizadas nos experimentos de determinação quantitativa de ME, RE e PE, para ambas as fontes de ionização (ESI e APCI), análise na coluna C18 Nucleosil *homemade* e emprego do tratamento por SPE.

TABELA 4.12– Precisão intradia (CV %) para a análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em fase móvel e na matriz. Pré-tratamento por SPE^a, coluna C18 Nucleosil e ionização por ESI e APCI.

Amostras	ESI				APCI			
	Microssomas ^e		Plasma Humano ^e		Microssomas ^e		Plasma Humano ^e	
	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)	Área ^f	Precisão (%)
SPE ^a Adição Antes ^b	4.213.632.377	4,69	5.465.057.462	3,34	22.095.719	9,87	25.265.029	23,44
SPE ^a Adição Pós ^c	4.958.559.619	1,55	5.999.817.389	3,00	31.003.814	6,30	22.239.682	9,72
Padrão ^d	6.540.594.599	1,25	6.540.594.599	1,25	38.323.017	0,88	38.323.017	0,88

^aExtração em fase sólida; ^bAdição da rifampicina feita antes ou ^cpós extração; ^dSolução de rifampicina em fase móvel; ^en = 5; ^fMédia das áreas.

Para as análises realizadas com a coluna C18 Nucleosil (Tabela 4.12) as precisões foram obtidas com valores de 1,55 a 23,44 %, sendo este último valor associado ao ME (42 % de supressão).

Ambas as condições cromatográficas avaliadas e de MS possibilitaram uma maior repetibilidade das medidas quando a rifampicina foi analisada na matriz microssomal, o que pode ser atribuído à menor concentração protéica deste biofluido quando comparada ao plasma humano.

Pode-se observar que os experimentos quantitativos executados para investigar o efeito de matriz na análise de RIF em fluidos biológicos forneceram informações além do valor de ME, obtendo-se também os valores de RE e PE. Ademais, como replicatas (n = 5) de cada amostra foram analisadas, a variabilidade das medidas dos experimentos foi avaliada.

Outra forma de se investigar o efeito de matriz é por meio de experimentos de infusão pós-coluna, nos quais uma análise qualitativa da mudança da eficiência de ionização do analito pode ser feita. A fim de avaliar o ME sob esta outra perspectiva, foram procedidos experimentos de análise da rifampicina nos fluidos biológicos, empregando os pré-tratamento de amostra *off-line*, e como condição LC-MS/MS, a coluna C18 Ascentis Express e ionização por ESI ou APCI.

4.4.2.1 – Determinação qualitativa do ME por experimento de infusão pós coluna: ESI vs. APCI

Uma das formas de se avaliar o efeito de matriz é através do experimento de infusão pós-coluna, no qual uma solução do analito é continuamente inserida entre a coluna analítica e a fonte de ionização do espectrômetro de massas (Figura 4.11). Dessa forma, através da injeção no sistema cromatográfico de extratos da matriz, o sinal relativo ao cromatograma de SRM é monitorado, e o efeito de matriz pode ser qualitativamente determinado pela diminuição ou aumento da resposta analítica (ANNESLEY, 2003; BONFIGLIO *et al.*, 1999; NIESSEN *et al.*, 2006).

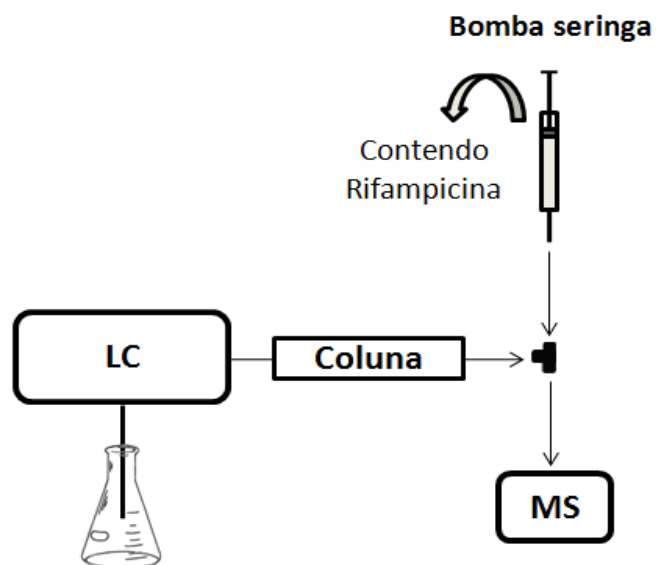


FIGURA 4.11 – Esquema do experimento de infusão pós-coluna.

Para os experimentos de infusão pós-coluna para a determinação do ME na análise de rifampicina, foram definidos: pré-tratamentos *off-line* das amostras (SPE ou PP), frações microssomais e plasma humano como matrizes biológicas, coluna cromatográfica C18 Ascentis Express e fonte de ionização por ESI ou APCI (Figura 4.12). Portanto, foram avaliados diferentes procedimentos de limpeza de amostras biológicas, mecanismo de ionização e natureza da matriz quanto à mudança na eficiência de ionização do analito.

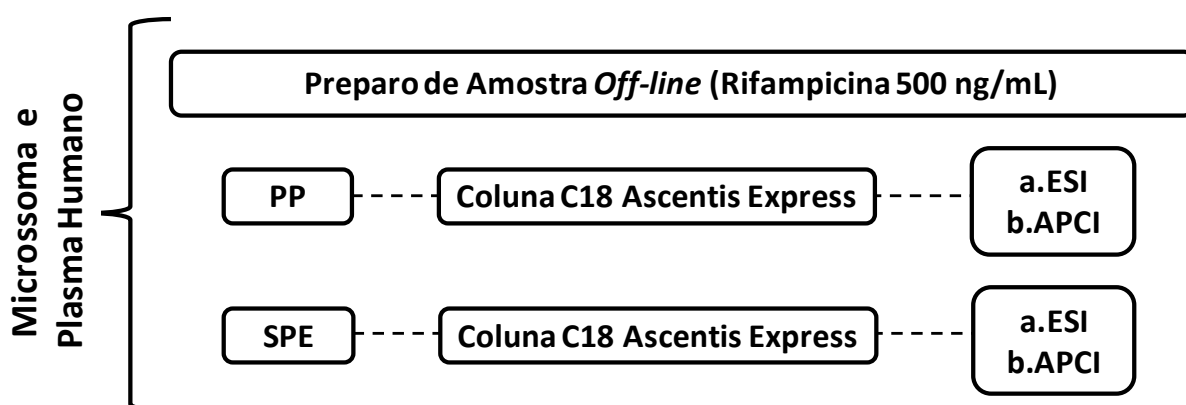


FIGURA 4.12 – Fluxograma dos experimentos de infusão pós-coluna feitos para a investigação do efeito de matriz qualitativo.

Para estes estudos de ME qualitativos, a solução de RIF contida na bomba seringa era de concentração 500 ng/mL, o que resultou na inserção no MS de uma

concentração de rifampicina de 23 ng/mL, visto que há a contribuição da vazão de fase móvel do sistema cromatográfico.

Nas Figuras 4.13 e 4.14 são apresentados os cromatogramas para a análise de RIF, tendo como fonte de ionização a ESI, e nas Figuras 4.15 e 4.16, a ionização por APCI. Pode-se notar que para cada mecanismo de ionização avaliado têm-se seis cromatogramas, os quais são provenientes de duas matrizes biológicas e três procedimentos de limpeza de amostra.

Quando a matriz microssomal foi submetida ao pré-tratamento por PP, seja com ACN ou MeOH como agentes precipitantes (Figuras 4.13 A e B), os experimentos de infusão pós-coluna revelaram um ME de supressão de ionização da RIF, quando o mecanismo de ionização por ESI foi utilizado. No entanto, quando SPE foi o método de extração aplicado (Figura 4.13 C) para essa mesma matriz, não foi possível notar uma supressão significativa do sinal analítico na região de análise da rifampicina. Este resultado era esperado, uma vez que a SPE promove uma limpeza de amostras mais eficiente do que PP.

Na análise de plasma humano (Figura 4.14), no tempo de retenção da RIF, não foi observado aumento ou supressão significativa da resposta analítica para o fluido biológico tratado quando comparado com o sinal analítico da água ou fase móvel, assim não foi observado efeito de matriz, independentemente do pré-tratamento de amostras utilizado. Neste caso, até mesmo para as amostras tratadas por PP, classificado como um procedimento de extração menos eficiente em eliminar compostos interferentes, os resultados qualitativos obtidos foram considerados satisfatórios no que concerne o ME. Os resultados obtidos podem estar associados a um tratamento de amostras mais eficiente para a matriz plasmática e às características da coluna Ascentis Express, a qual pode ter promovido uma eficiente separação cromatográfica dos possíveis interferentes prejudiciais ao processo de ionização da rifampicina durante as análises de plasma humano.

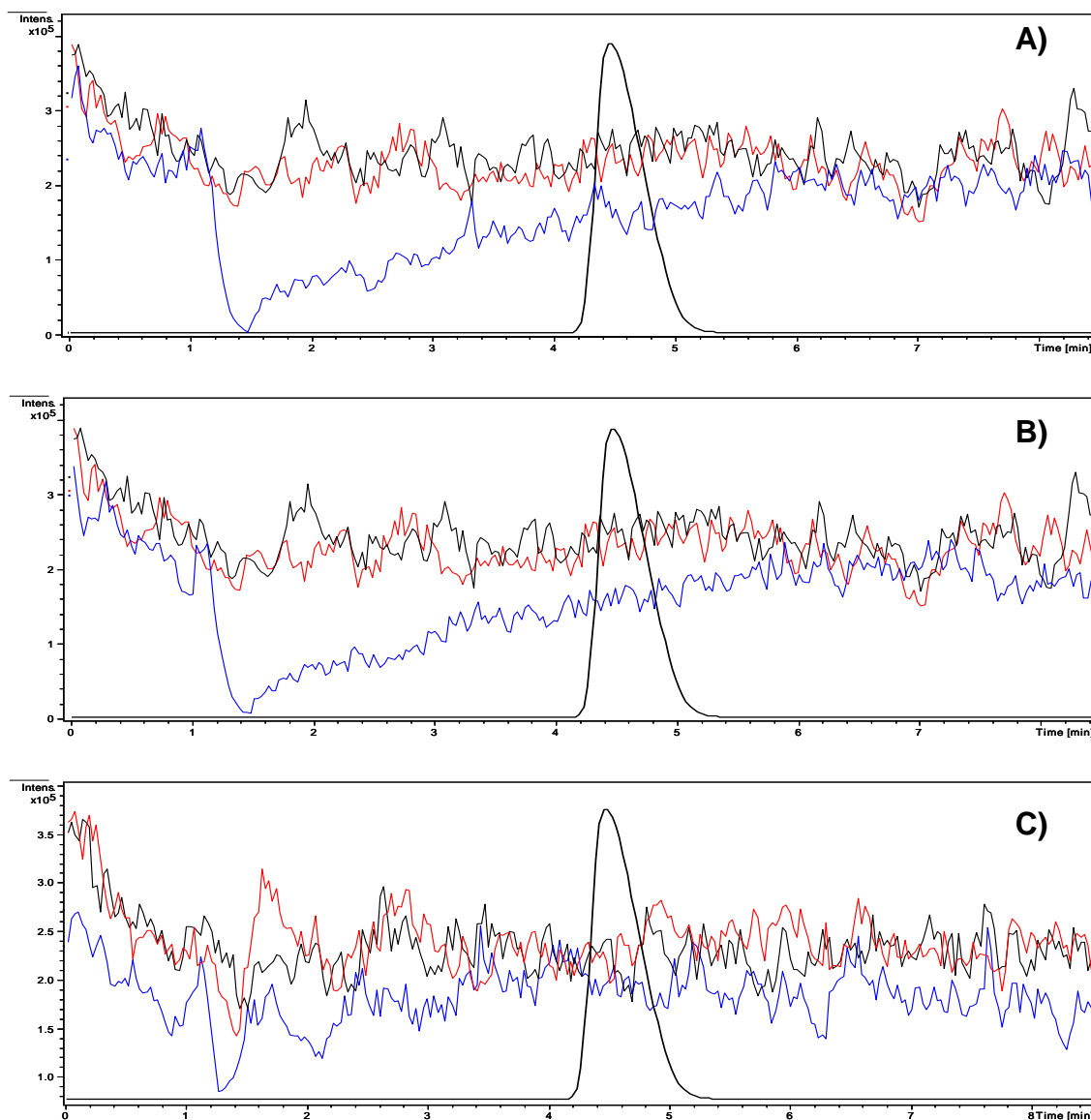


FIGURA 4.13 – Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão HPLC: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μ L; Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μ L/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H₂O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H₂O; (- - - - -) fase móvel, e (- - - - -) injeção de extrato de microsoma tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.

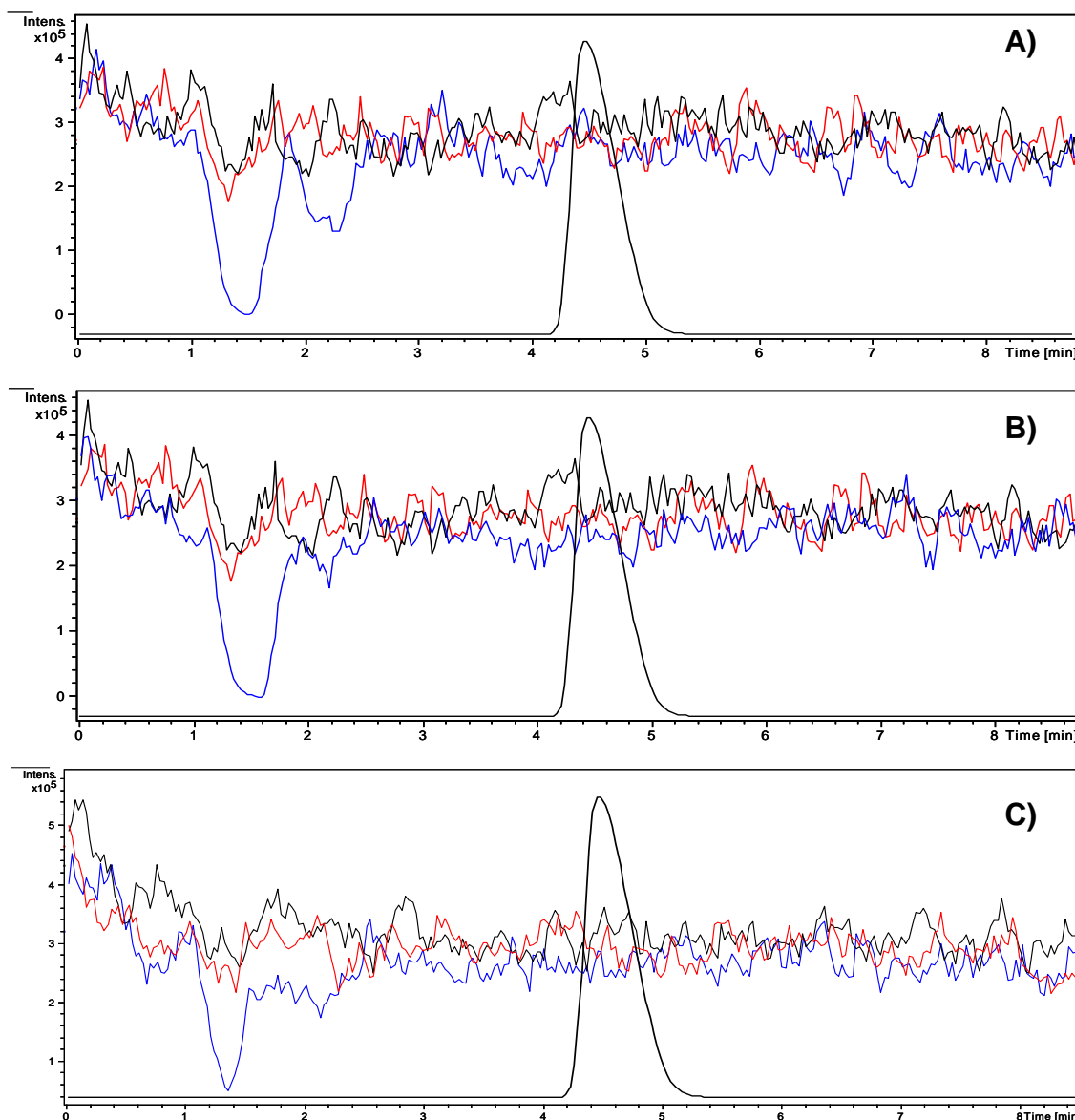


FIGURA 4.14 – Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão HPLC: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μ L; Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μ L/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H₂O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H₂O; (- - - - -) fase móvel, e (- - - - -) injeção de extrato de plasma humano tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.

Analisando as Figuras 4.15 e 4.16 correspondentes às análises das mesmas amostras, com fonte de ionização por APCI, foi observado um aumento de ionização em todos os pré-tratamentos de amostra empregados, para ambos os fluidos biológicos. Portanto, pode-se inferir que o mecanismo de ionização por APCI mostrou ser mais susceptível ao efeito de matriz que a ESI. Este resultado condiz com o perfil de ME observado nos experimentos quantitativos e pode ser atribuído às propriedades físico-químicas da RIF. Portanto, é possível perceber que a escolha do mecanismo de ionização é um fator crucial para o desenvolvimento de um método analítico, visto que o efeito de matriz pode ser reduzido quando uma fonte de ionização adequada é utilizada (EECKHAUT *et al.*, 2009; SOUVERAIN *et al.*, 2005a).

Comparando os diferentes preparos de amostra *off-line*, foi possível perceber que, independente do mecanismo de ionização, a SPE foi mais eficiente na redução do ME, o que significa uma eliminação de interferentes da matriz mais eficaz.

Com relação aos resultados obtidos nos estudos de ME qualitativo e quantitativo, quando os preparos de amostra por SPE e PP são empregados, foi possível notar tendências de ME bastante diferentes. Para os experimentos de infusão pós-coluna os perfis de ME refletiram as discrepâncias entre os métodos de extração, ou seja, para todos os experimentos a SPE foi mais adequada para a limpeza da amostra e eliminou mais eficientemente interferentes que viessem a prejudicar a ionização da RIF, salvo apenas o caso de tratamento de plasma humano e ionização por ESI, no qual, independente do procedimento de limpeza de amostra aplicado, não houve ME. Já para a determinação quantitativa do ME (Tabela 4.6), a PP mostrou ser tão eficiente quanto a SPE no que concerne a redução do ME, ou ainda melhor, como no caso da extração de plasma humano e emprego da ESI como fonte de ionização. Dessa forma, pode-se inferir que para os experimentos de quantificação do ME, uma eficiente separação cromatográfica promovida pela coluna analítica foi um fator sobressalente, enquanto que para os estudos qualitativos as diferenças existentes entre os pré-tratamentos de amostras mostraram ser fatores importantes para minimizar o ME.

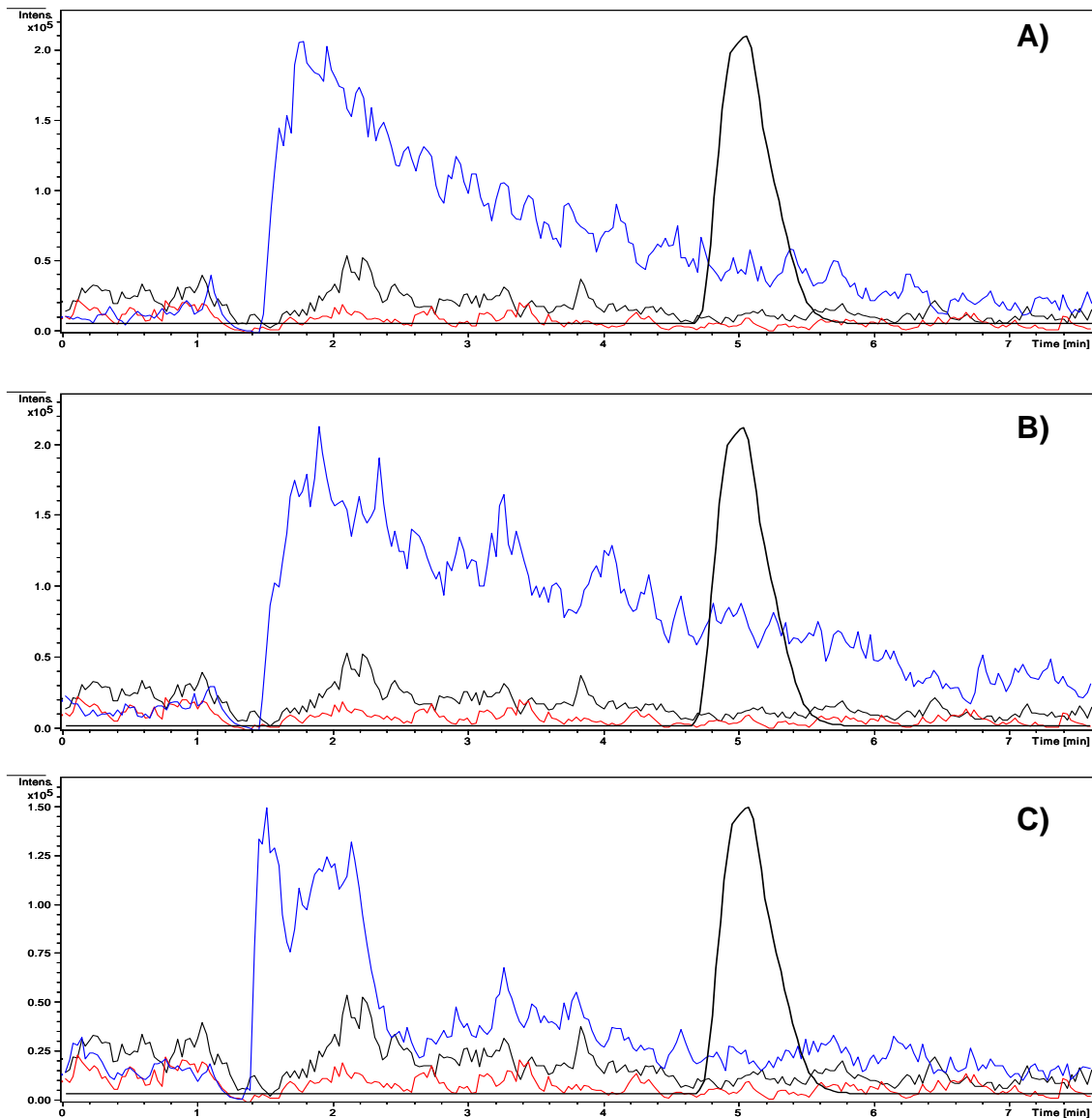


FIGURA 4.15 – Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μ L; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μ L/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H₂O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H₂O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de microsossoma tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.

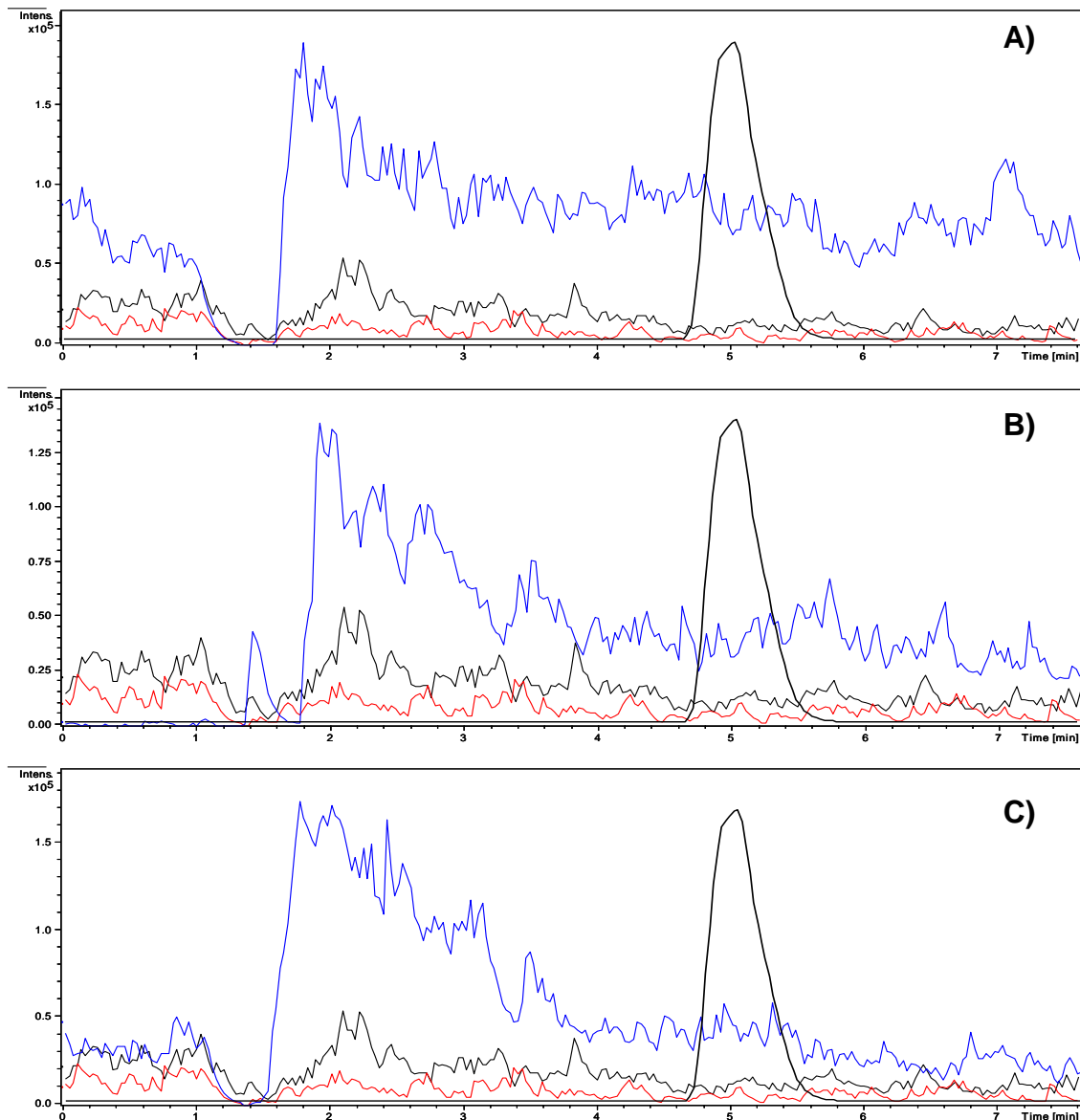


FIGURA 4.16 – Cromatogramas relativo à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina. Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 μ L; Ionização: APCI (+); Corona: + 4000 nA; Amplitude de fragmentação: 0,19; Bomba seringa: 10 μ L/min contendo rifampicina 500 ng/mL em MeOH/ H₂O (1:1, v/v); sendo os cromatogramas relativos a injeção de (-----) H₂O; (-----) fase móvel, e (-----) injeção de extrato de plasma humano tratado por A) PP(ACN), B) PP(MeOH), e C) SPE.

Mediante os melhores resultados obtidos para a determinação de RIF em frações microssomais ou plasma humano, nos quais colunas cromatográficas foram avaliadas, assim como diferentes fontes de ionização, alguns parâmetros foram definidos para os estudos posteriores, com emprego de procedimentos de preparo de amostras *on-line*. A coluna C18 Ascentis Express foi selecionada para o desenvolvimento do método multidimensional, sendo usada na segunda dimensão, e o mecanismo de ionização selecionado foi a ESI.

4.5 – Colunas RAM-BSA

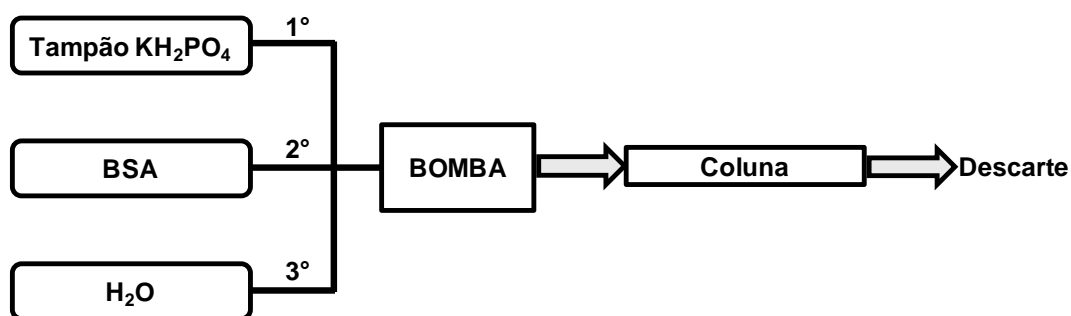
4.5.1 – Obtenção e avaliação das colunas RAM-BSA

A busca por procedimentos analíticos rápidos, seletivos, sensíveis e ecologicamente corretos, fez surgir uma nova tendência em preparo de amostras: a configuração *on-line*. Neste caso, trabalha-se com duas colunas acopladas através de uma válvula seletora, sendo na primeira dimensão empregada uma coluna extratora e, na segunda dimensão, uma coluna analítica. Especificamente com relação à cromatografia líquida, novas fases estacionárias foram desenvolvidas a fim de possibilitar a injeção direta de amostras, procedendo dessa forma, a limpeza da matriz *on-line*. Nesse quadro situam-se as colunas monolíticas, de polímeros molecularmente impressos, a cromatografia de fluxo turbulento e as fases de meio de acesso restrito (RAM) (CASSIANO, *et al.*, 2006; CASSIANO, *et al.*, 2009; DIONÍSIO, *et al.*, 2010).

O emprego *on-line* de colunas RAM tem se mostrado uma alternativa de grande utilidade, visto sua ampla aplicabilidade na injeção direta de amostras complexas (matrizes biológicas, ambientais e alimentícias) no sistema cromatográfico.

Com relação ao procedimento de obtenção destas colunas extratoras, mais especificamente, as colunas imobilizadas com a proteína BSA, algumas discussões são válidas. Na Figura 4.17 é apresentado um esquema referente ao preparo da coluna RAM-BSA, o qual consiste de três etapas: imobilização da proteína, formação das bases de Schiff, e por fim, a redução das iminas e dos grupos aldeídos residuais.

Imobilização da BSA



Formação de Bases de Schiff



Redução das iminas e de grupos aldeído residuais

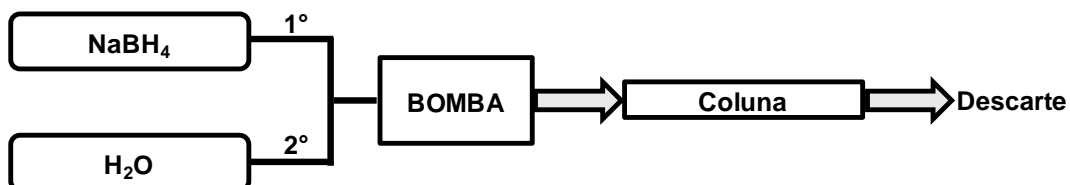


FIGURA 4.17 – Esquema do procedimento de preparo das colunas RAM-BSA.

Na primeira etapa de preparo das colunas RAM-BSA vale destacar que a imobilização da BSA foi realizada *in situ* por Cromatografia Frontal.

Na seqüência, glutaraldeído é passado pela fase estacionária com o intuito de reagir com a proteína BSA, formando bases de Schiff (iminas). Adicionalmente, o glutaraldeído, que é uma molécula que apresenta grupos aldeídos em ambas as terminações, liga-se às proteínas pelas duas extremidades, promovendo o intercruzamento entre as BSAs, conferindo maior estabilidade a fase obtida, e evitando perdas de proteínas no decorrer do uso da coluna (LIMA, 2004). Na Figura 4.18 constam as reações químicas pertinentes.

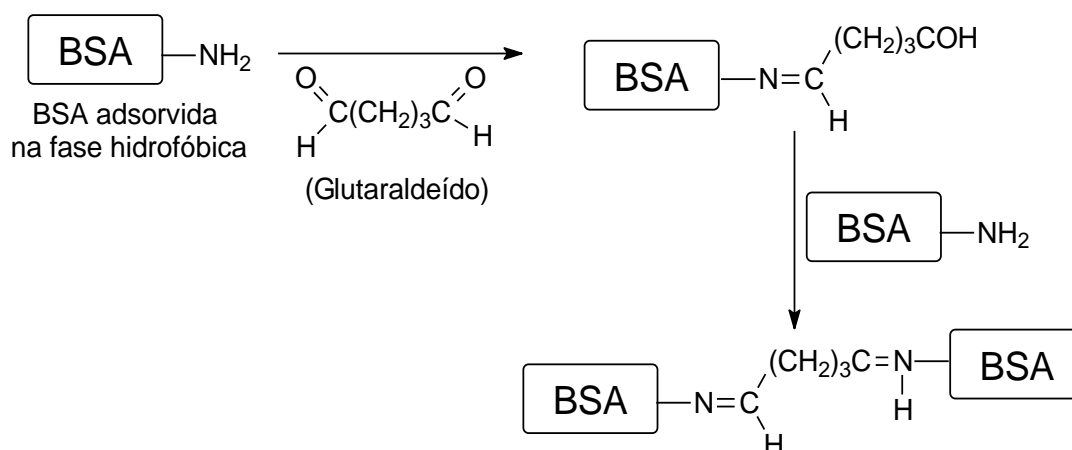


FIGURA 4.18 – Reação entre a BSA immobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff, e subsequente intercruzamento de ligações (LIMA, 2004).

As bases de Schiff formadas na segunda etapa podem sofrer hidrólise, bem como os grupos aldeídos residuais podem reagir com moléculas da amostra a ser injetada. Assim, para que isso seja evitado, o borohidreto reduz as iminas e os aldeídos (Figura 4.19), garantindo boa estabilidade e durabilidade à coluna RAM (LIMA, 2004).

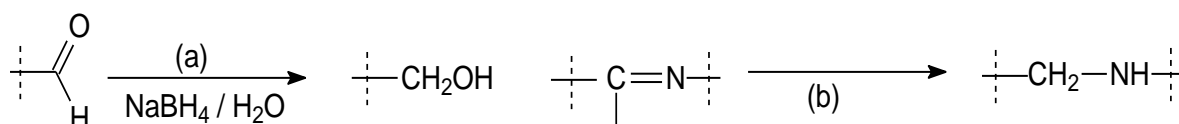


FIGURA 4.19 – Reações de (a) redução dos aldeídos residuais e (b) das iminas (LIMA, 2004).

Depois de obtidas, as colunas RAM-BSA são avaliadas quanto a sua eficiência de exclusão protéica, que representa a capacidade de promover a limpeza da biofluido que está sendo injetado na coluna extratora. O método estabelecido por LIMA *et al.*, 2006 baseia-se na determinação do teor protéico que é excluído pela coluna RAM em comparação com a quantia inicialmente injetada.

Ao longo dos anos, muitos métodos espectrofotométricos têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, porém não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Dentre os mais utilizados, têm-se o método do “Coomassie Brilliant Blue”, BG-250 ou reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). Este foi o procedimento escolhido para a determinação das proteínas excluídas pela coluna RAM por ser de fácil execução, sujeito a um número

menor de interferentes, mais rápido e sensível frente a outros procedimentos existentes (ZAIA, 1998). Além disso, é um método já bem estabelecido em nosso laboratório e amplamente aplicado para diferentes matrizes biológicas.

4.5.2 – Seleção da coluna RAM-BSA

No grupo foram realizados trabalhos científicos avaliando diferentes suportes cromatográficos para o preparo de colunas RAM-BSA (5 x 0,46 cm D.I.) para serem utilizadas na análise dos antibióticos isoniazida, pirazinamida e rifampicina. Foram selecionadas quatro fases hidrofóbicas e duas fases de troca iônica, sendo respectivamente: octil (C8), octadecil (C18), ciano (CN), fenil (Ph), troca aniônica fraca (WAX, do inglês *Weak Anion-Exchange*) e troca catiônica forte (SCX, do inglês *Strong Cation-Exchange*) (de CARVALHO *et al.*, 2010; DENADAI *et al.*, 2009c). As colunas RAM-BSA foram preparadas de acordo com procedimento descrito por LIMA *et al.*, 2006 e na Figura 4.20 são mostradas as estruturas químicas dos suportes cromatográficos correspondente às colunas extratoras.

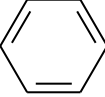
Coluna	Estrutura Química
C ₈ -BSA	—(CH ₂) ₇ CH ₃
C ₁₈ -BSA	—(CH ₂) ₁₇ CH ₃
Ph-BSA	—(CH ₂) ₃ — 
CN-BSA	—(CH ₂) ₃ CN
SCX-BSA	—SO ₃ H
WAX-BSA	$\left\{ \begin{array}{l} \text{—NH}_2 \\ \text{—NHR} \\ \text{—NR}_2 \end{array} \right.$

FIGURA 4.20 – Fases estacionárias utilizadas nas colunas RAM-BSA.

No procedimento de tratamento de amostras empregando-se colunas RAM, os primeiros minutos da corrida cromatográfica são dedicados à exclusão das macromoléculas com concomitante retenção do analito de interesse. Assim, o primeiro passo do desenvolvimento de um método analítico para estas colunas envolve a otimização da fase móvel para esta etapa inicial. Para isso, deve-se levar em consideração a composição da matriz biológica, a fim de evitar uma possível precipitação protéica (o que ocasionaria o entupimento da coluna) e também as características do analito, de modo a promover uma maior interação do mesmo com a fase estacionária, para que assim, a substância alvo não seja eluída durante o processo de extração da amostra.

Baseando-se nas considerações acima apresentadas e os resultados obtidos no grupo para a análise de rifampicina em diferentes colunas RAM-BSA, as colunas RAM com fases C8, C18, WAX e SCX mostraram ser apropriadas para o desenvolvimento do método analítico, uma vez que a retenção da RIF foi maior que o tempo necessário para efetuar a exclusão das proteínas.

4.5.3 – Coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.)

Para o desenvolvimento do método de preparo de amostra *on-line* com emprego da coluna RAM foi inicialmente selecionada uma coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.).

A coluna RAM-C18-BSA de sílica Luna (10 μm , 100 Å) foi preparada de acordo com procedimento descrito por LIMA *et al.*, 2006 e avaliada com relação sua eficiência de exclusão protéica pelo método de Bradford (descrito na parte experimental 3.4.8.3), porém, devido as menores dimensões desta coluna, algumas modificações no procedimento original foram feitas: 1) vazão HPLC de 0,2 mL/min; 2) foram feitas duas coletas de 2 mL do eluato; 3) na reação entre a proteína e o corante, os volumes foram modificados para 500 μL da solução eluída pela coluna extratora e 3,00 mL da solução Comassie *Blue*; e 4) o branco adotado foi uma solução do corante, preparado adicionando-se 500 μL de água Milli-Q e 3,00 mL de solução Comassie *Blue*. Os valores de eficiência de exclusão obtidos são mostrados no gráfico de barras apresentado na Figura 4.21.

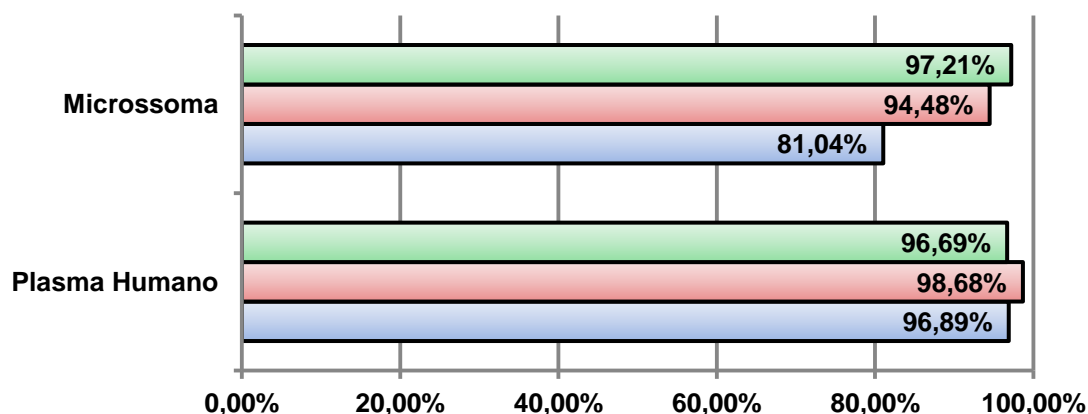


FIGURA 4.21 – Eficiência de exclusão protéica de frações microssomais e plasma humano pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.), nos dois primeiros minutos de eluição. Volumes de injeção: 200 µL, 100 µL, e 50 µL.

A coluna RAM-C18-BSA, mesmo com menores dimensões do que as colunas convencionais, mostrou um alto poder de exclusão das proteínas provenientes das matrizes biológicas injetadas, nos dois primeiros minutos de corrida cromatográfica, apresentando valores médios de eficiência de exclusão de 90,91 % para as frações microssomais e 97,42 % para o plasma humano. A diferença de exclusão protéica entre as duas coletas realizadas (de 0 a 2 min e de 2 a 4 min) pode ser observada na Figura 4.22, na qual consta o espectro de absorvância referente à amostra de 50 µL de plasma humano injetado na coluna RAM-C18-BSA. A solução referência representa 100 % das proteínas excluídas.

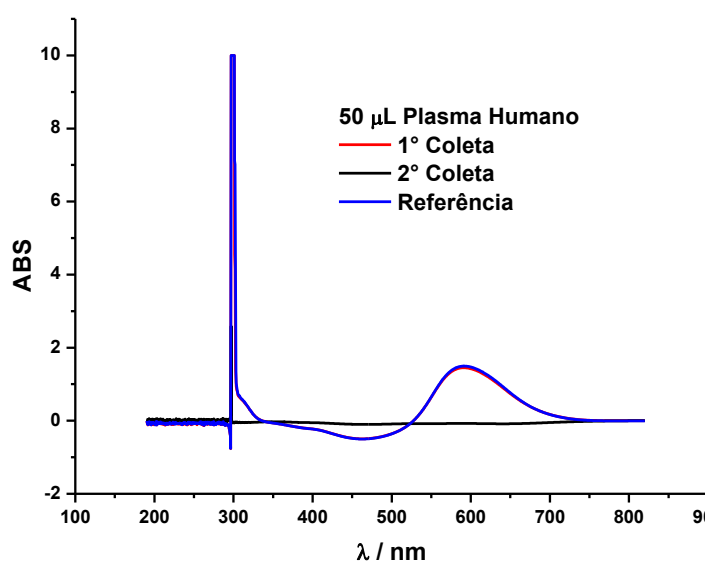


FIGURA 4.22 – Espectro de absorvância para a avaliação da exclusão protéica de plasma humano pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.). Volume de injeção: 50 µL.

Na Figura 4.22 é notável que logo na primeira coleta executada (eluato de 0 a 2 min) praticamente toda proteína injetada no sistema cromatográfico é excluída pela coluna RAM, visto que o espectro obtido é coincidente com o da solução referência. Para a segunda fração coletada (eluato de 2 a 4 min), percebe-se que não há a presença de proteínas, uma vez que o valor zero de absorvância foi conseguido em 596 nm.

Para cada volume de injeção, medidas em triplicatas eram feitas, e os coeficientes de variação (CV %) para as replicatas são mostrados na Tabela 4.13.

TABELA 4.13 – Precisão (CV %) das análises durante a avaliação da exclusão das proteínas provenientes de plasma humano e de frações microssomais pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) nos dois primeiros minutos de corrida cromatográfica.

Matriz	Volume de Injeção (μL)	CV (%)
Plasma Humano ^a	50	1,84
	100	2,04
	200	6,09
Microssoma ^a	50	8,07
	100	5,68
	200	3,60

^an = 3.

Pode-se inferir que a precisão do método de Bradford, expressa pelos valores de CV %, foi satisfatória, com valores de CV sempre menores que 10 %, independente do volume de biofluido injetado (50, 100 e 200 μL) na coluna extratora.

4.5.4 – Desenvolvimento do método analítico unidimensional

O desenvolvimento de um método analítico, quando uma coluna RAM é utilizada, envolve quatro etapas. A primeira delas é a determinação da fase móvel de exclusão protéica com retenção seletiva do composto de interesse; a segunda etapa envolve o ajuste das condições cromatográficas para a eluição do analito; em terceiro é a etapa de limpeza da coluna, eliminando possíveis interferentes que possam estar ainda retidos; e por fim o re-condicionamento da coluna extratora com

a fase móvel otimizada na primeira etapa. Para ilustrar estas quatro etapas, na Figura 4.23 é mostrado um cromatograma adquirido por LC-UV para uma solução de rifampicina, uma amostra de microssoma fortificado com RIF e uma amostra branco.

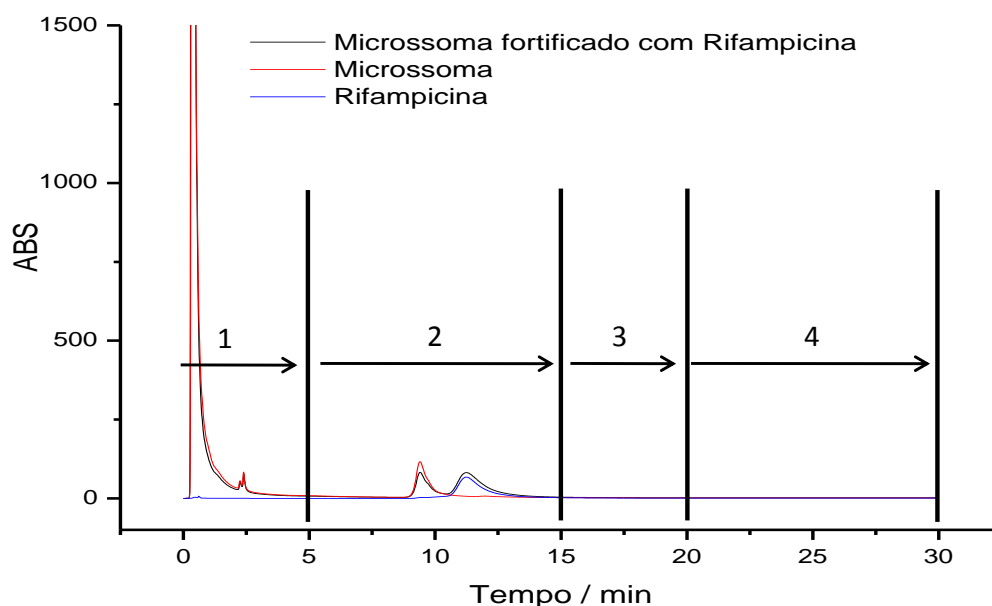


FIGURA 4.23 – Cromatograma referente à análise de rifampicina em frações microssomais. Sistema LC-UV: coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μ m, 100 Å); volume de injeção: 50 μ L; vazão: 1,0 mL/min e λ = 254 nm. Etapa 1: Exclusão das proteínas microssomais e retenção seletiva da rifampicina; Etapa 2: Eluição da rifampicina; Etapa 3: Limpeza da coluna RAM; Etapa 4: Re-condicionamento da coluna extratora com a fase móvel otimizada para a etapa 1.

Como etapa inicial do desenvolvimento do método para a coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.), a eluição protéica pela coluna RAM foi monitorada, através da injeção de diferentes volumes (10, 50 e 100 μ L) da matriz biológica e monitoramento no comprimento de onda 290 nm, relativo à absorção máxima das proteínas (LÜTHI-PENG E PUHAN, 1999). Na Figura 4.24 consta o cromatograma obtido para o plasma humano, e este experimento serviu de base para que o tempo de exclusão fosse estipulado, ou seja, o tempo mínimo necessário no qual o fármaco tuberculostático deve ficar retido, para um dado volume de injeção.

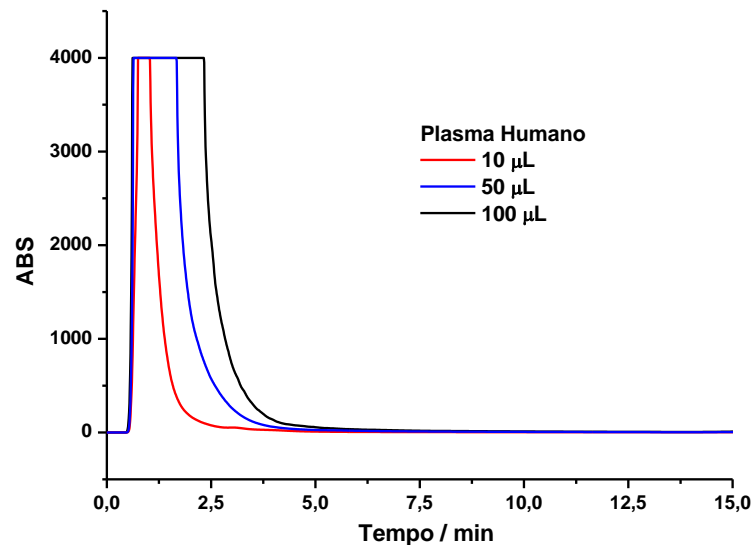


FIGURA 4.24 – Perfis cromatográficos referentes à exclusão protéica pela coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) quando diferentes volumes de plasma humano são injetados: **10 µL**, **50 µL** e **100 µL**. Fase móvel: 100 % de H₂O; vazão: 0,2 mL/min e λ : 290 nm.

Mediante os estudos já realizados no grupo, a rifampicina apresentou retenção satisfatória (> 60 min) durante o tempo de exclusão proteica quando a fase móvel H₂O foi empregada, sendo esta então, definida como o eluente para a etapa de limpeza do biofluido neste trabalho. Na etapa 2 de eluição da RIF foram testados eluentes com misturas em diversas proporções volumétricas de H₂O e MeOH, tendo sempre a presença de 0,02 % de FA. A simulação do tempo e fase móvel de exclusão também era realizada para que o método como um todo pudesse ser avaliado.

Os resultados obtidos revelaram que para a coluna RAM-C18-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) a rifampicina apresentava uma retenção muito elevada, sendo que proporções com até 85 % de MeOH foram testadas, e mesmo assim a RIF eluia em aproximadamente 17 min, o que implica em um método cromatográfico com um alto tempo de análise. Além disso, para o método multidimensional, a fase móvel ajustada para a coluna analítica (Ascentis Express) apresentava 62 % de MeOH, assim, a análise na primeira dimensão tinha uma força eluotrópica maior que a segunda, o que levaria a uma menor interação do analito com a coluna analítica, comprometendo a eficiência cromatográfica. Adicionalmente, notou-se, para essa coluna extratora de 3,0 x 0,21 cm D.I. baixa repetibilidade entre diferentes injeções da amostra.

Uma coluna RAM-C8-BSA (3,0 x 0,21 cm D.I.) também foi testada, visando uma menor interação da rifampicina com a fase estacionária, porém, os mesmos problemas foram observados (Figura 4.25).

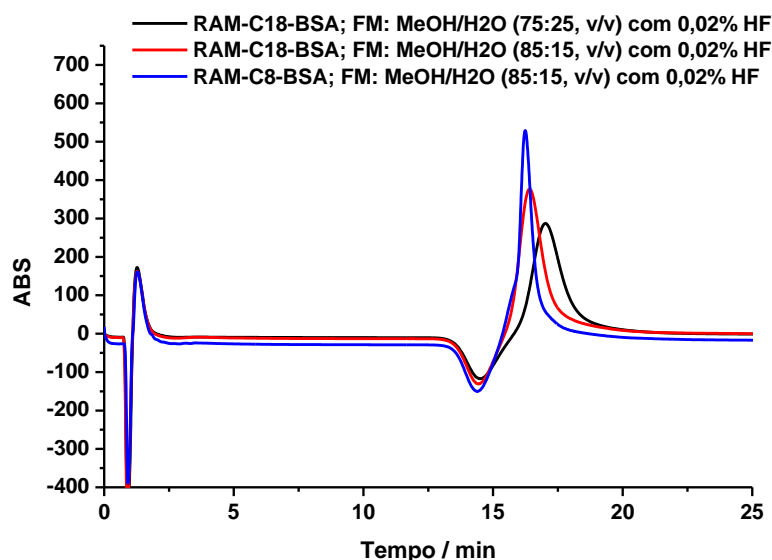


FIGURA 4.25 – Cromatogramas da análise de rifampicina (50 µg/mL) nas colunas RAM-C8-BSA e RAM-C18-BSA (ambas 3,0 x 0,21 cm D.I.). Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 50 µL; Vazão 0,2 mL/min e $\lambda = 254$ nm.

Pela Figura 4.25 pode-se constatar que para a coluna extratora de fase hidrofóbica C8 uma banda cromatográfica mais estreita foi obtida, o que para um método multidimensional significa um menor tempo de transferência. Mediante esta observação, juntamente com os resultados obtidos para a coluna RAM-C18-BSA, decidiu-se por com uma coluna RAM-BSA de suporte C8, e de dimensões convencionais de 5,0 x 0,46 cm D.I., para o desenvolvimento do método cromatográfico de preparo de amostra *on-line*.

4.5.5 – Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.)

Com a coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 µm, 100 Å) efetuou-se o desenvolvimento do método uni e multidimensional de pré-tratamento *on-line* das matrizes plasma humano e frações microssomais e análise da rifampicina. Esta

coluna extratora já se encontrava disponível no grupo e foi preparada e avaliada quanto à sua eficiência de exclusão protéica, conforme descrito anteriormente.

Na etapa de extração do fluido biológico pela coluna RAM-C8-BSA, o tempo de exclusão protéica foi determinado pela injeção de 50 μL de fluido biológico não fortificado e a exclusão protéica foi acompanhada por UV ($\lambda = 290 \text{ nm}$). As fases móveis empregadas foram H_2O para o plasma humano, e H_2O com 0,05 % FA, para as frações microssomais, sendo a vazão de 1,0 mL/min (Figura 4.26).

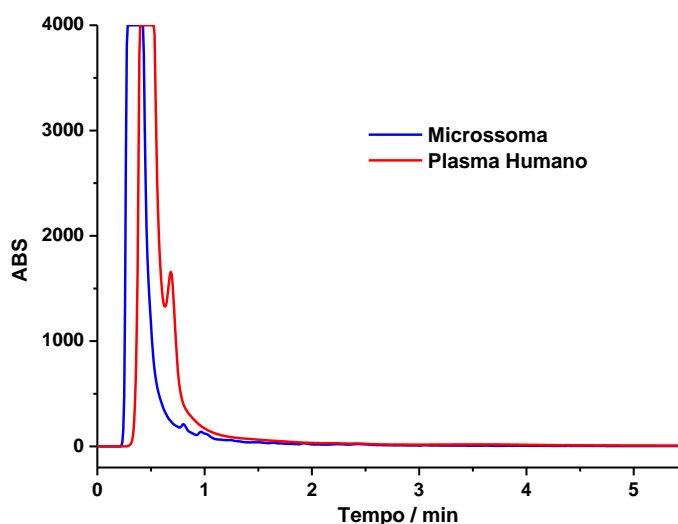


FIGURA 4.26 – Cromatogramas de exclusão das proteínas das (—) frações microssomais e (---) plasma humano pela coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μm , 100 \AA). Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 50 μL ; Fase móvel: H_2O para o plasma humano, e H_2O com 0,05 % FA, para a fração microssomal (10 mg/mL); Vazão 1,0 mL/min e $\lambda = 290 \text{ nm}$.

Foi considerado um tempo de exclusão protéica de 5 min para ambas as matrizes biológicas (Figura 4.26).

Para a etapa de eluição da RIF pela coluna extratora foi utilizado a fase móvel otimizada para a coluna analítica, MeOH/ H_2O (62:38, v/v) com 0,02 % FA.

Para a limpeza da coluna RAM-BSA empregou-se ACN / H_2O / ISO (75:15:10, v/v/v) como fase móvel, uma vez que devido a sua maior força eluotrópica, procede-se a eliminação de compostos da matriz de menor polaridade, enquanto que isopropanol auxilia também na remoção de possíveis lipídios.

As condições cromatográficas desenvolvidas para o método cromatográfico unidimensional, com o emprego da coluna RAM-C8-BSA, como coluna extratora e analítica, está descrito nas Tabelas 3.5 e 3.6 do procedimento experimental.

4.5.6 – Coluna RAM-C8-BSA e C18 Ascentis Express: método multidimensional de análise

Colunas RAM podem ser utilizadas no modo simples de análise, porém, de um modo geral, estas colunas RAM possuem baixa eficiência analítica, e por esse motivo, elas são usualmente utilizadas em sistemas de duas dimensões, acopladas a uma coluna analítica, na segunda dimensão, dando origem a Cromatografia Multidimensional. Neste caso, além das vantagens relacionadas ao pré-tratamento *on-line*, tem-se o acréscimo de seletividade proporcionado pela adição de mais uma dimensão de separação cromatográfica (CASSIANO, *et al.*, 2006; CASSIANO, *et al.*, 2009; MULLETT, 2007).

Um sistema HPLC multidimensional está ilustrado na Figura 4.27, na qual é possível notar a presença de uma válvula seletora de seis caminhos, que realiza o acoplamento entre as colunas.

Quando uma análise multidimensional é procedida, primeiramente a coluna extratora é carregada com o analito (posição 1). Na posição 2, a banda cromatográfica do analito de interesse é seletivamente transferida da coluna extratora para a coluna analítica.

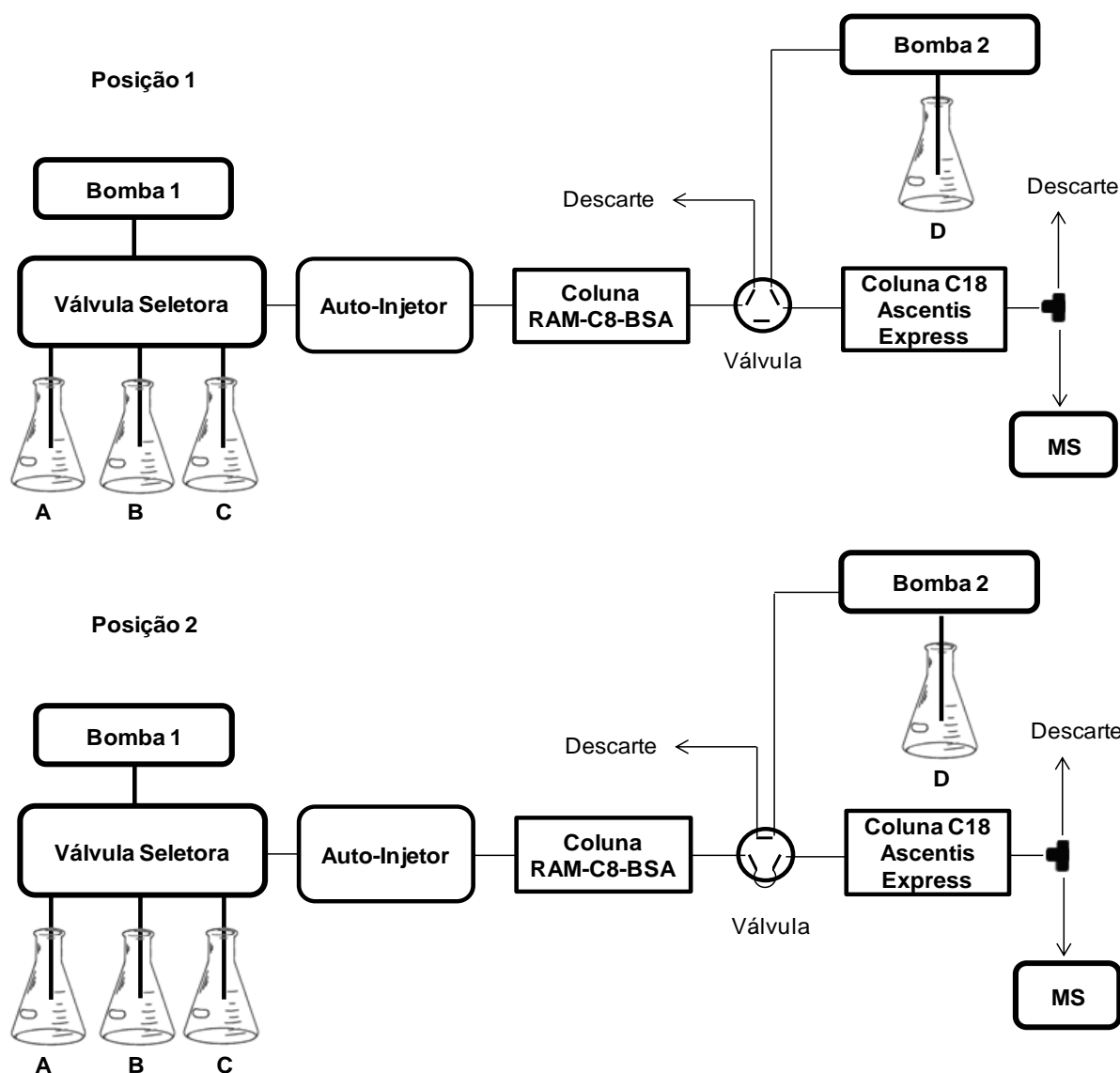


FIGURA 4.27 – Esquema do sistema de cromatografia multidimensional.

O método LC-MS/MS utilizado para a análise de RIF na configuração em duas dimensões foi descrito na Tabela 3.9 do procedimento experimental. As condições cromatográficas para a coluna extratora foram as mesmas empregadas no método unidimensional e as condições da coluna analítica na segunda dimensão foram as mesmas otimizadas para a análise das amostras tratadas por extração *off line*. Para o acoplamento das colunas RAM e Ascentis Express foi necessário a utilização de um divisor de fluxo entre elas, visto a incompatibilidade da vazão da fase móvel entre as colunas.

4.6 – Efeito de Matriz: Pré-tratamento *On-line*

4.6.1 – Determinação quantitativa do Efeito de Matriz

A determinação do efeito de matriz, com tratamento de amostras *on-line*, com emprego da coluna RAM-C8-BSA na configuração uni e multidimensional, foram procedidos todos da mesma forma. Nesta etapa do trabalho, apenas ensaios do ME por meio de experimentos quantitativos foram realizados. Vale ressaltar que não é possível efetuar a fortificação com o analito pós-extração nos pré-tratamentos *on-line*, dessa forma, a adição do analito na matriz antes de sua injeção na coluna extratora representa o efeito de matriz associado à eficiência de recuperação da coluna RAM-BSA.

Amostras em replicatas foram analisadas, tanto do biofluido fortificado com RIF (n = 5), quanto da matriz branco (n = 2). Para o tratamento matemático dos resultados obtidos utilizou-se as relações:

- Solução Padrão (rifampicina em fase móvel) – Área **A**
- Extrato do biofluido fortificado **ANTES** da extração – Área **B**

Efeito de Matriz (ME) %

$$ME = (B / A) \times 100$$

A Figura 4.28 ilustra a seqüência de experimentos realizados, nos quais foi empregada a concentração de 500 ng/mL de rifampicina e fonte de ionização ESI.

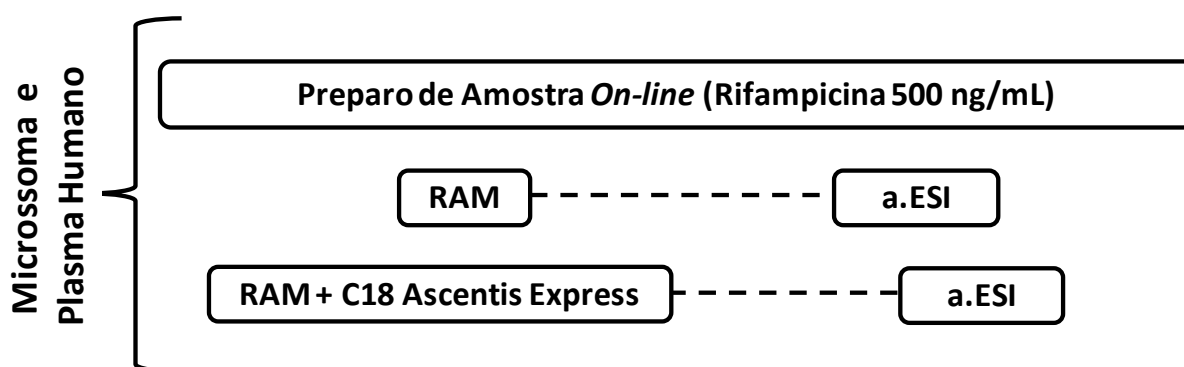


FIGURA 4.28 – Fluxograma dos experimentos feitos para a investigação do efeito de matriz com emprego de preparo de amostra *on-line* das matrizes biológicas.

4.6.2 – Coluna RAM-C8-BSA no modo unidimensional vs. multidimensional

O efeito de matriz foi determinado através da relação matemática entre os valores das áreas dos cromatogramas de SRM obtidos para as amostras fortificadas e das áreas referentes à injeção do analito em fase móvel.

Na Figura 4.29 têm-se os cromatogramas para a análise do extrato resultante do microsoma fortificado com rifampicina e deste analito em solvente (transição SRM m/z 823 \rightarrow 791), sendo em A o método com emprego da coluna RAM no modo simples de análise e em B a configuração multidimensional.

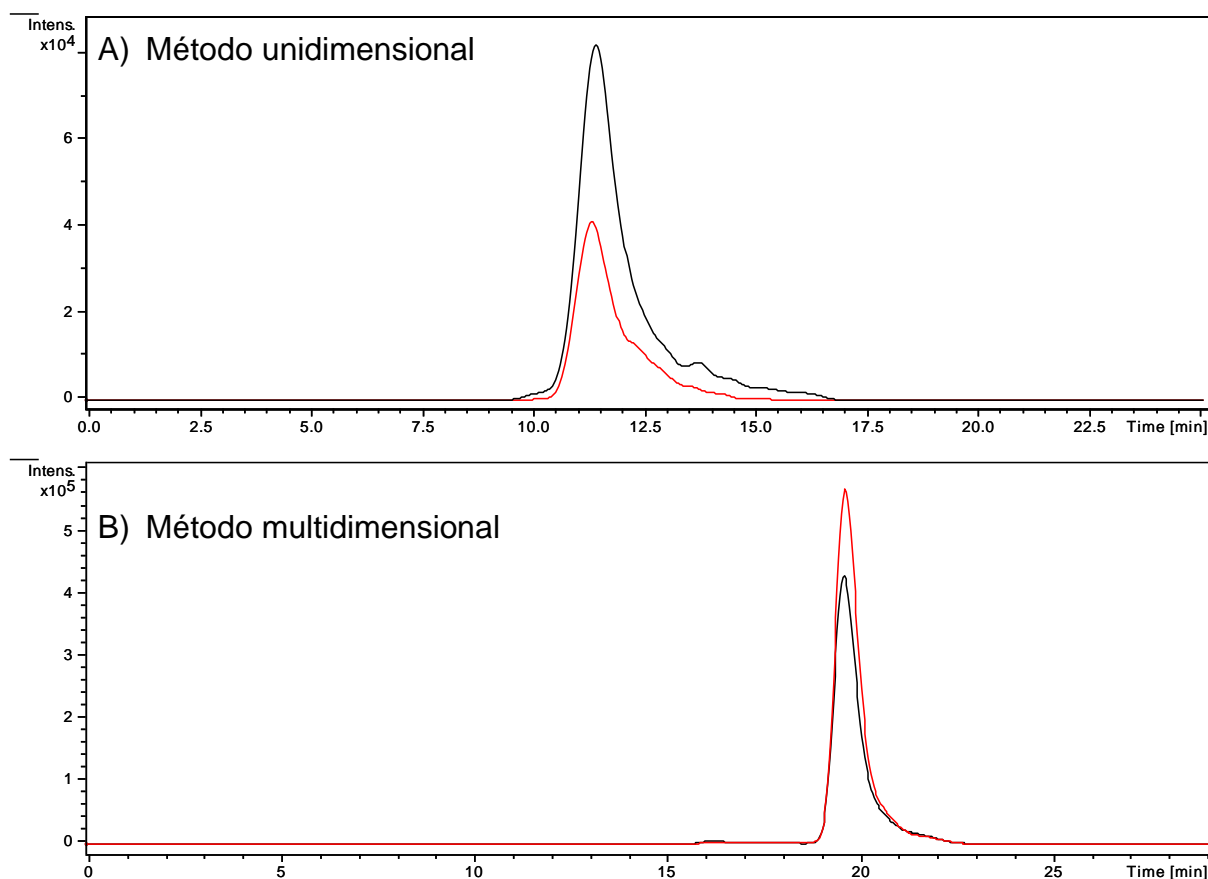


FIGURA 4.29 – Cromatogramas relativos à transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 para a análise de rifampicina empregando-se os métodos: A) unidimensional (coluna RAM); e B) multidimensional (colunas RAM + Ascentis Express).

Condições HPLC:

1° dimensão (aplicado aos métodos uni e multidimensional) – Coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μ m, 100 Å); Volume de injeção: 50 μ L; Fase móvel de exclusão: H₂O com 0,05 % FA; Fase móvel de análise: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; vazão HPLC: 1,0 mL/min. Injeção de: (-----) rifampicina 500 ng/mL em H₂O, e (-----) microsoma fortificado com rifampicina (500 ng/mL na matriz).

2° dimensão (aplicado ao método multidimensional) – Coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 μ m); Fase móvel: MeOH/H₂O (62:38, v/v) com 0,02 % FA; Vazão: 0,2 mL/min.

Condições MS/MS: Vazão de entrada no MS: 100 μ L/min (ajustada com divisor de fluxo); Ionização: ESI (+); Amplitude de fragmentação: 0,19.

Os resultados obtidos para o ME estão descritos na Figura 4.30, bem como os valores de coeficientes de variação pertinentes, mostrados na Tabela 4.14.

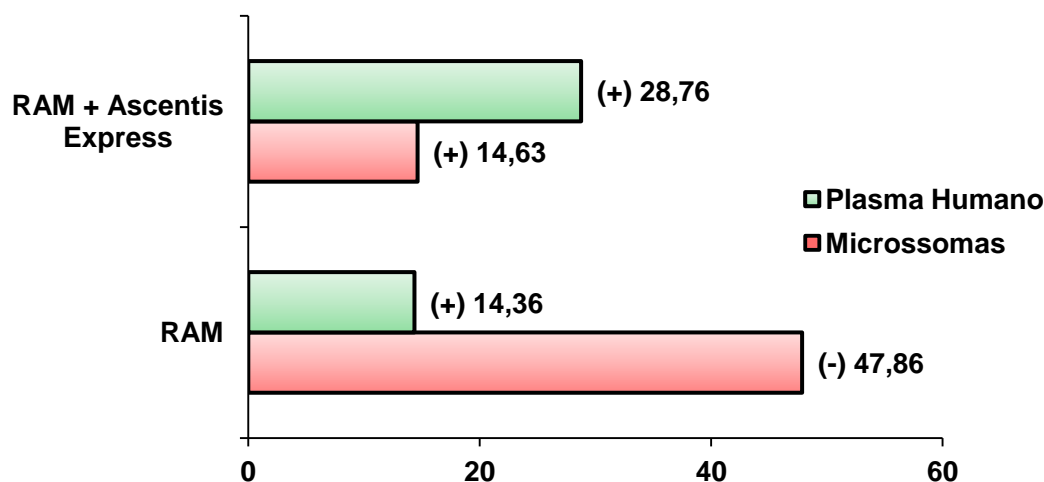


FIGURA 4.30 – Valores obtidos de ME para a análise da rifampicina em plasma humano e frações microssomais quando comparados o emprego *on-line* da coluna RAM-C8-BSA nas configurações unidimensional e multidimensional.

TABELA 4.14 – Precisão intradia (CV %) da análise de rifampicina (SRM m/z 823 → 791) em água e na matriz biológica. Pré-tratamentos *on-line*.

Amostra	Unidimensional ^a			
	Microssoma ^d		Plasma Humano ^d	
	Área ^e	Precisão (%)	Área ^e	Precisão (%)
Matriz Fortificada	3.414.102	14,95	842.060	38,73
Padrão ^c	6.548.559	4,12	753.194	11,87
Amostra	Multidimensional ^b			
	Microssoma ^d		Plasma Humano ^d	
	Área ^e	Precisão (%)	Área ^e	Precisão (%)
Matriz Fortificada	25.058.410	12,93	32.848.496	11,03
Padrão ^c	22.381.388	7,22	25.511.304	7,65

^aRAM; ^bRAM + Ascentis Express; ^cSolução de rifampicina em água; ^dn = 5; ^eMédia das áreas.

Pelos resultados da Figura 4.30, pode-se verificar que para o biofluido microssomal um menor ME foi obtido para o método multidimensional, pois a adição

de mais uma dimensão na análise, aumentou a seletividade do método cromatográfico. Ainda, esta avaliação é fortalecida pela precisão das medidas referentes ao pré-tratamento das frações microssomais, nos quais os valores situam-se abaixo de 15 % (Tabela 4.14).

Para o plasma humano, um maior valor de ME foi observado quando esta matriz era submetida ao pré-tratamento *on-line* no modo multidimensional do que na configuração unidimensional. Entretanto, examinando a Tabela 4.14, nota-se uma baixa precisão das medidas relacionadas ao plasma humano e o método em uma dimensão de análise, sendo o valor de CV = 38,73 %. Portanto, a confiabilidade desses dados, e conseqüentemente desta comparação, fica comprometida. Ademais, para a solução padrão de RIF em água, foi obtida um precisão de 11,87 %, o que infere na presença de erros sistemáticos de manipulação, extração e de respostas do espectrômetro de massas para estas medidas.

Com relação a análises das amostras dos fluidos biológicos sem adição do analito (branco), nenhum íon interferente para a transição SRM m/z 823 \rightarrow 791 foi detectado.

CONCLUSÕES

*“É o tempo da travessia ...
e se não ousarmos fazê-la ...
teremos ficado ... para sempre ...
à margem de nós mesmos...”.*

Fernando Pessoa

5 – CONCLUSÕES

A associação entre as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Espectrometria de Massas (MS) resultou em um sistema analítico de grande utilidade e importância, visto suas qualidades de alto poder de separação promovida pela HPLC somado a alta sensibilidade e seletividade relacionada à MS. Dessa forma, a LC-MS tem sido amplamente empregada na determinação de moléculas em fluidos biológicos, alimentícios e ambientais (CAPPIELLO *et al.*, 2010; GOSETTI *et al.*, 2010). Para que a validade de tais métodos quantitativos seja garantida, o estudo do efeito de matriz (ME) deve ser realizado, uma vez que resultados errôneos e/ou não reprodutíveis podem ser gerados, caso ele seja negligenciado (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

Ensaio bioanalítico foram conduzidos a fim de investigar o ME na análise de rifampicina quando os seguintes parâmetros foram avaliados: procedimentos de pré-tratamento de amostras, eficiências cromatográficas, fontes de ionização, e natureza da matriz biológica.

Para os métodos de extração *off-line* com análise de RIF (50 µg/mL) na coluna C18 Ascentis Express (10,0 x 0,21 cm D.I.; 2,7 µm, 90 Å) e ionização por ESI, o menor ME para a fração microssomal foi observado quando o procedimento de SPE foi aplicado (ME = 2,4 %), enquanto para o plasma humano foi a PP(MeOH) (ME = 4,0 %). Para a análise de RIF na coluna C18 Nucleosil (10,0 x 0,21 cm D.I.; 5 µm, 100 Å) nestas mesmas condições de ionização, a SPE foi o procedimento mais eficaz na redução do ME para ambos os fluidos biológicos (ME = 24,2 % para o microssoma, e ME = 8,3 % para o plasma humano). No geral, a fase estacionária de sílica com tecnologia *Fused Core* foi a condição cromatográfica que proporcionou um ME menos pronunciado, sendo então, a coluna Ascentis Express selecionada para os experimentos de ME confrontando-se diferentes mecanismos de ionização.

A quantificação do ME foi realizada empregando-se diferentes fontes de ionização a pressão atmosférica (ESI e APCI) e resultados mais homogêneos entre SPE e PP foram constatados para a ionização da RIF (50 µg/mL) por APCI, no entanto, para esta fonte os valores ME foram maiores do que aqueles conseguidos para a ionização por ESI. Experimentos de infusão pós-coluna foram executados e a APCI também mostrou ser o mecanismo de ionização mais susceptível ao ME que a ESI, para a análise da RIF (500 ng/mL) nos fluidos biológicos avaliados.

A investigação do ME, quando as fontes de ionização por APCI e ESI foram comparadas, também foi procedida empregando-se a coluna C18 Nucleosil, porém apenas o método de extração por SPE foi aplicado.

Para os procedimentos de fortificação antes e após a extração aplicados aos pré-tratamentos *off-line*, valores de recuperação (RE) e eficiência de processo (PE) também foram obtidos empregando-se diferentes colunas cromatográficas e fontes de ionização. Os valores de RE e PE apresentaram precisão na faixa de 2,1 a 12,7 %, e 3,6 a 25,4 % para o tratamento de microssoma e plasma humano respectivamente.

Métodos LC-ESI-MS/MS de análise da RIF (500 ng/mL) foram desenvolvidos com emprego *on-line* da coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm D.I.; 10 μ m, 100 Å) no modo simples e multidimensional de análise, sendo neste último caso, estabelecido como segunda dimensão a coluna analítica C18 Ascentis Express. Para a matriz microssomal um ME menos pronunciado foi notado para a configuração multidimensional (ME = 14,63 %; e unidimensional, ME = 47,86 %), assim foi possível inferir que a adição de mais uma dimensão de separação cromatográfica resultou em um método analítico mais seletivo para a molécula estudada. Para o plasma humano foi obtido um ME de 14,36 % e 28,76 % quando submetido ao pré-tratamento uni e multidimensional, respectivamente. Porém, para este biofluido, a comparação entre estes resultados foi comprometida pela baixa precisão intradia atribuída aos dados do método em uma dimensão, no qual o coeficiente de variação das análises foi de 38,73 %.

Considerando todos os estudos realizados neste projeto, confrontando os fluidos biológicos analisados, ora um ME menos pronunciado era constatado para as frações microssomais, e outrora era observado para o plasma humano.

Para todas as amostras extraídas *off-line* e *on-line* foi possível notar uma melhor precisão das medidas relacionadas aos microssomas fortificados com RIF (1,07 a 14,95 %) do que para o plasma humano (1,97 a 38,73 %).

No geral, o ME deve ser analisado sob dois pontos: 1) seu valor absoluto, e 2) a precisão das medidas das amostras dos biofluidos fortificados com rifampicina pós-extração. Quando valores absolutos de ME elevados são obtidos, tem-se que a linearidade de resposta (sinal vs. concentração), os limites de quantificação e a detecção do método analítico podem ser afetados. Já medidas com repetibilidade comprometida, nas quais os valores de CV não se encontram em uma faixa

confiável, a precisão e a exatidão é que serão os parâmetros prejudicados. Cabe ao analista ponderar tais fatores para que seu método possa ser melhorado e aplicado com confiabilidade para a obtenção dos resultados.

Como relatado na presente dissertação, um amplo estudo de ME foi procedido para a análise de rifampicina nas matrizes plasma humano e frações microsomais e objetivou-se investigá-lo sob diferentes condições de tratamento de amostra e de parâmetros LC-MS. Foi demonstrado que a determinação do efeito de matriz é uma etapa imprescindível no desenvolvimento de métodos analíticos por LC-MS/MS e, como estratégias de avaliação de tal fenômeno, têm-se a investigação do preparo de amostra, da eficiência cromatográfica e do mecanismo de ionização. E, além disso, vale ressaltar que o ME é dependente da natureza do analito e do fluido biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*“O sábio não é o homem que fornece
as verdadeiras respostas ...
é o que formula as verdadeiras
perguntas”.*

Claude Lévi-Strauss

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. Resolução nº 899, de 29/05/2003.

ANNESLEY, T. A. "Ion suppression in mass spectrometry". *Clin. Chem.*, **49** (7): 1041, 2003.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. London, John Wiley & Sons, 2003. p. 1 - 18.

BAO, D.; TRUONG, T-T.; RENICK, P. J.; PULSE, M. E. & WEISS, W. J. "Simultaneous determination of rifampicin and levofloxacin concentrations in catheter segments from a mouse model of a device-related infection by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 723, 2008.

BARALLA, E.; NIEDDU, M.; BOATTO, G.; VANORI, M. V.; PALOMBA, D.; DEMONTIS, M. P.; PASCIU, V. & ANANIA, V. "Quantitative assay for bradykinin in rat plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**: 557, 2011.

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**: 384, 2010.

BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V. & MERKLE, K. "The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13** (12): 1175, 1999.

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248, 1976.

BUHRMAN, D.; PRICE, P. I. & RUDEWICZ, P. J. "Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography – tandem mass spectrometry: a study of ion suppression". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **7**: 1099, 1996.

CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; PALMA, P. & TRUFELLI, H. "Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry". *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **33**: 1067, 2010.

CARVALHO, P. H. V. de; ICERI, T. M.; DENADAI, M. & OLIVEIRA, R. V. "Avaliação de fases RAM-BSA de troca iônica para a análise de fármacos antituberculose em biofluidos". *Livro de Resumos do 4º Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins*. Campos do Jordão – SP, 2010. p. 220.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. São Carlos, EdUFSCar, 2001. p. 5 -70.

CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; PIETRO, A. C. de & 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". *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**: 1462, 2006.

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): 557, 2009a.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas". *Quim. Nova*, **32** (4): 1021, 2009b.

CÉSAR, I. C.; RIBEIRO, J. A. de A.; TEIXEIRA, L. de S.; BELLORIO, K. B.; ABREU, F. C. de; MOREIRA, J. M.; CHELLINI, P. R. & PIANETTI, G. A. "Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma: application for a pharmacokinetic study". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**: 114, 2011.

CHEN, L.; WANG, H.; ZENG, Q.; XU, Y.; SUN, L.; XU, H. & DING, L. "On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography – a review". *J. Chromatogr. Sci.*, **47**: 614, 2009.

CHICO, J.; MECA, S.; COMPANYÓ, R.; PRAT, M. D. & GRANADOS, M. "Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: application to food and environmental analysis". *J. Chromatogr. A*, **1181**: 1, 2008.

COVEY, T. R.; THOMSON, B. A. & SCHNEIDER, B. B. "Atmospheric pressure ion sources". *Mass Spectrom. Rev.*, **28**: 870, 2009.

DAMS, R. & HUESTIS, M. A. "Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**: 1290, 2003.

DEGANI, A. L. G. & CASS, Q. B. & VIEIRA, P. C. "Cromatografia: um breve ensaio". *Quim. Nova Escola*, **7**: 21, 1998.

DENADAI, M.; BELAZ, K. R. A. & OLIVEIRA, R. V. "Análise de rifampicina em frações microssomais por cromatografia líquida de alta eficiência". *Livro de Resumos do 17º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti*. Araraquara – SP, 2009a. **QA-21**, p. 187.

DENADAI, M. *Estudo do Metabolismo In Vitro da Rifampicina Empregando Frações Microssomais e Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. São Carlos, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – UFSCar, 2009b. Relatório de Iniciação Científica, 60 p.

DENADAI, M.; BELAZ, K. R. A. & OLIVEIRA, R. V. “Avaliação sistemática de colunas de acesso restrito imobilizadas com proteínas para a retenção seletiva de antibióticos antituberculose”. *Livro de Resumos da 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza – CE, 2009c. **QA-134** e Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1852-1.pdf>>. Acesso em: 13 Mar. 2010.

DING, J.; REN, N.; CHEN, L. & DING, L. “On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of macrolide antibiotics in environmental water”. *Anal. Chim. Acta*, **634**: 215, 2009.

DIONIZIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M. & CASS, Q. B. “Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida”. *Scientia Chromatographica*, **2**: 19, 2010.

ECKHAUT, A. V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I. & MICHOTTE, Y. “Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects”. *J. Chromatogr. B*, **877**: 2198, 2009.

ELLARD, G. A. & FOURIE, P. B. “Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption”. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **3** (11): S301, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation.*, 66 (100): 11, 2001.

FRANÇOIS, I.; SANDRA, K. & SANDRA, P. “Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations - a review”. *Anal. Chim. Acta*, **641**: 14, 2009.

FRIED, K. & WAINER, I. W. “Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when”. *J. Chromatogr. B*, **689**: 91, 1997.

GEORGI, K. & BOOS, K. S. “Multidimensional on-line SPE for undisturbed LC-MS-MS analysis of basic drugs in biofluids”. *Chromatographia*, **63** (11/12): 523, 2006.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. & MOLINA-DÍAZ, A. “Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry”. *J. Chromatogr. A*, **1217**: 3736, 2010.

GONG, Z.; BASIR, Y.; CHU, D. & MCCORT-TIPTON, M. “A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of anti-tuberculosis drugs - ethambutol and pyrazinamide in human plasma”. *J. Chromatogr. B*, **877**: 1698, 2009.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D. & GENNARO M. C. “Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry”. *J. Chromatogr. B*, **1217**: 3929, 2010.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. "The body fluid compartments: extracellular and intracellular fluids; interstitial fluid and edema". IN: *Textbook of Medical Physiology*. 11a ed. Philadelphia, Saunders, 2006. p. 291 – 306.

HIRABAYASHI, A. "Evaporation of charged fine droplets". *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **175**: 241, 1998.

HOFFMANN, E. de. "Tandem mass spectrometry: a primer". *J. Mass Spectrom.*, **31**: 129, 1996.

HOFFMANN, E. de & STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3a ed. London, John Wiley & Sons, 2007. p. 1 - 10.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; SIBUM, M.; POSTIGO, C.; ALDA, M. L. & BARCELÓ, D. "Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction - liquid chromatography - electrospray - tandem mass spectrometry". *Anal. Chem.*, **81**: 4285, 2009.

KEBARLE, P. & VERKERK, U. H. "Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now". *Mass Spectrom. Rev.*, **28**: 898, 2009.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C. & OLAH, T. "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**: 942, 2000.

LIMA, V. V. *Colunas de Acesso Restrito e Biorreatores de Enzima de GAPDH: Desenvolvimento e Aplicação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 200 p.

LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M. & CASS, Q. B. "Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano". *Quim. Nova*, **29** (1): 72, 2006.

LOOS, U.; MUSCH, E.; JENSEN, J. C.; MIKUS, G.; SCHWABE, H. K. & EICHELBAUM, M. "Pharmacokinetics of oral and intravenous rifampicin during chronic administration". *Klin Wochenschr*, **63**: 1205, 1985.

LÜTHI-PENG, Q. & PUHAN, Z. "Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, **393**: 227, 1999

MACLAFFERTY, F. W. & TURECEK, F. *Interpretation of Mass Spectra*. 4. ed. Sausalito: University Science Books, 1993. p. 7.

MARTIN, A. J. P. & SYNGE, R. L. M. "A new form of chromatogram employing two liquid phases". *Biochem. J.*, **35**: 1358, 1941.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L. & CHAVEZ-ENG, C. M. "Matrix effect in quantitative analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations". *Anal. Chem.*, **70** (5): 882, 1998.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L. & CHAVEZ-ENG, C. M. "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Anal. Chem.*, **75** (13): 3019, 2003.

MAURER, H. H. "Liquid chromatography - mass spectrometry in forensic and clinical toxicology". *J. Chromatogr. B*, **713**: 3, 1998.

MULLETT, W. M. "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis". *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**: 263, 2007.

NG, K-Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Y. L.; HYBERTSON, B. M.; RANDOLPH, T. W. & CHRISTIANS, U. "Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography – tandem mass spectrometry with on-line extraction". *J. Chromatogr. B*, **847**: 188, 2007.

NIESSEN, W. M. A. *Liquid chromatography - mass spectrometry*. 3a ed. Boca Raton, Taylor & Francis Group: CRC Press, 2006. p. 33 – 41, 289 – 297.

PAVLOVIC, D. M.; BABIC, S.; HORVAT, A. J. M. & KASTELAN-MACAN, M. "Sample preparation in analysis of pharmaceuticals". *Trends Anal. Chem.*, **26** (11): 1062, 2007.

PHILLIPS, I. R. & SHEPHARD, E. A. *Methods in Molecular Biology: Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, Humana Press, 1998. p. 58 – 59.

PRASAD, B. & SINGH, S. "In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of rifampicin using an optimized sample preparation approach and modern tools of liquid chromatography–mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**: 474, 2009.

RAO, N. G.; RAMACHANDRA, B.; VALI, R. M. & RAJU, S. S. "LC–MS/MS studies of ritonavir and its forced degradation products". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **53**: 833, 2010.

ROMÃO, S.; CADENA, S. M. S. C.; AMORIM, J. C.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; ROCHA, M. E. M.; NOLETO, G. R.; CARNIERI, E. G. S.; MARTINEZ, G. R. & OLIVEIRA, M. B. M. "Metabolism of the mesoionic compound (mi-d) by mouse liver microsomes, detection of its metabolite in vivo, and acute toxicity in mice". *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **23** (6): 394, 2009.

ROSA, H. J. de. *Efeitos da Rifampicina na Farmacocinética e Hepatotoxicidade da Isoniazida*. Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNESP, 2006. Dissertação de mestrado, 96 p.

SEGURA, P. A.; GAGNON, C. & SAUVÉ, S. "Application of turbulent flow chromatography load columns for the on-line analysis of anti-infectives in wastewaters". *Chromatographia*, **70**: 239, 2009.

SHELLIE, R. A. & HADDAD, P. R. "Comprehensive two-dimensional liquid chromatography". *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**: 405, 2006.

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J. *Mass Spectrometry. Principles of Instrumental Analysis*. 4a ed. Orlando, Saunders College Publishing, 1992. p. 420 – 458.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F. & WATSON, D. "Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS". *Chromatographia Suppl.*, **55**: S-95, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. "Detector sensitivity and selectivity". IN: *Practical HPLC Method Development*. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1997. p. 89 – 96.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J-L. "Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures". *J. Chromatogr. A*, **1058**: 61, 2004a.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J-L. "Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis". *J. Chromatogr. B*, **801**: 141, 2004b.

STOOB, K.; SINGER, H. P.; GOETZ, C. W.; RUFF, M. & MUELLER, S. "Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography – tandem mass spectrometry: quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters". *J. Chromatogr. A*, **1097**: 138, 2005.

TAYLOR, P. J. "Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry". *Clin. Biochem.*, **38**: 328, 2005.

TÖLGYESIA, Á.; SHARMA, V. K.; KOVACSICS, L. & FEKETE, J. "Quantification of corticosteroids in bovine urine using selective solid phase extraction and reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. B*, **878**: 1471, 2010.

VOET, D. & VOET, J. G.; *Biochemistry*. 3a ed. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 2004. p. 1309.

WALAWALKAR, P. S.; SERAI, P. S. & IYER, K. R. "Isolation and catalytic competence of different animal liver microsomal fractions prepared by calcium-aggregation method". *Indian J. Pharm. Sci.*, **68** (2): 262, 2006.

XIA, Y-Q. & JEMAL, M. "Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**: 2125, 2009.

XU, R. N.; FAN, L.; KIM, G. E. & EL-SHOUBAGY, T. A. "A monolithic-phase based on-line extraction approach for determination of pharmaceutical components in human plasma by HPLC-MS/MS and a comparison with liquid-liquid extraction". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**: 728, 2006.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V. & LICHTIG, J. "Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes". *Quim. Nova*, **21** (6): 787, 1998.

ZHENG, J. J.; LYNCH, E. D. & UNGER, S. E. "Comparison of SPE and fast LC to eliminate mass spectrometric matrix effects from microsomal incubation products". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**: 279, 2002.

ZHOU, H.; ZHANG, Y.; BIGGS, D. L.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W.; CHRISTIANS, U.; HYBERTSON, B. M. & NG, K-Y. "Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages". *J. Control. Release*, **107**: 288, 2005.